

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

NEOVASKULARISATION UND TISSUE ENGINEERING

IN VIVO UND IN VITRO UNTERSUCHUNGEN ZUR PRÄFABRIKATION VON FREIEN

HAUTLAPPEN UND GEZÜCHTETEN KONSTRUKTEN

HABILITATIONSSCHRIFT

vorgelegt von

Dr. med. NGUYEN THE HOANG

MÜNCHEN 2008

Aus dem
Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
(Direktor: Univ. Prof. Dr. med. B. Gänsbacher)

Klinik und Poliklinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie
(Vorstand: Univ. Prof. Dr. med. H.-G. Machens)

HNO-Klinik und Poliklinik
(Direktor: Univ. Prof. Dr. med. H. Bier)

der Technischen Universität München

Neovaskularisation und Tissue Engineering

in vivo und in vitro Untersuchungen zur Präfabrikation von freien
Hautlappen und gezüchteten Konstrukten

Habilitationsschrift

an der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München

vorgelegt von

Nguyen The Hoang

2008

**Meinen Eltern und
meiner Familie**

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
2. Aktueller Stand der Forschungsarbeit	3
2.1. Hautdefektrekonstruktion	3
2.2. Präfabrizierte Hautlappen	16
2.3. Tissue Engineering von Knorpelgewebe	24
3. Zielsetzung und Fragestellung	31
4. Material und Methoden	33
4.1. Studie I: Neovaskularisation in präfabrizierten Hautlappen	33
4.1.1. Versuchstiere	33
4.1.2. Operationsvorbereitung und Anästhesie	33
4.1.3. Operationstechnik	34
4.1.3.1. Modell 1: Endständige Ligatur des arterio-venösen Gefäßstieles.....	35
4.1.3.2. Modell 2: Endständige Anastomose des arterio-venösen Gefäßstieles.	36
4.1.3.3. Modell 3: Isolierte arterialisierete venöse Gefäßschlinge	36
4.1.3.4. Modell 4: Isolierte arterielle Gefäßschlinge	38
4.1.3.5. Modell 5: Arterio-venöse Gefäßstiele mit Gewebe-Expandern	38
4.1.3.6. Kontrollgruppe	39
4.1.4. Postoperative Therapie und Beobachtungszeiträume	39
4.1.5. Untersuchungsparameter	40
4.1.5.1. Makroskopische Beurteilung und gestielte Lappentransplantation	40
4.1.5.2. Blutbilduntersuchungen	41
4.1.5.3. Szintigraphische Untersuchungen	41
4.1.5.4. Selektive Mikroangiografie	43
4.1.5.5. Histologische Untersuchungen	46
4.2. Studie II: Präfabrizierte Hautlappen in Kombination mit gezüchteten Knorpelzell-Biomaterialkonstrukten	47
4.2.1. Versuchstiere und Knorpelgewinnung	47
4.2.2. In vitro Zellkultivierung und Zell-Biomaterialkonstruktherstellung	47
4.2.2.1. Zellisolierung und Amplifikation	47
4.2.2.2. Zellträgermaterial	49
4.2.2.3. Einbau gezüchteter Knorpelzell-Biomaterialkonstrukte	49

4.2.3.	In vivo Versuchablauf	49
4.2.3.1.	Präfabrikation vom Bauchhautlappen	49
4.2.3.2.	Implantation gezüchteter Knorpelzell-Biomaterialkonstrukte	50
4.2.4.	Beobachtungszeitraum	51
4.2.5.	Untersuchungsparameter	51
4.2.5.1.	Makroskopische Beurteilung und freie mikrovaskuläre Transplantation	51
4.2.5.2.	Selektive Mikroangiographie	51
4.2.5.3.	Histologische und immunhistochemische Untersuchungen	51
5.	Ergebnisse	53
5.1.	Studie I: Neovaskularisation in präfabrizierten Hautlappen	53
5.1.1.	Makroskopische Beurteilung und gestielte Lappentransplantation	54
5.1.2.	Blutbilduntersuchungen	57
5.1.3.	Szintigraphische Untersuchungen	57
5.1.4.	Selektive Mikroangiographie	63
5.1.5.	Histologische Untersuchungen	74
5.2.	Studie II: Präfabrizierte Hautlappen in Kombination mit gezüchteten Knorpelzell-Biomaterialkonstrukten	81
5.2.1.	In vitro Ergebnisse	81
5.2.1.1.	Chondrozytengewinnung und –vitalität	81
5.2.1.2.	Gezüchtete Knorpelzell-Biomaterialkonstrukte	81
5.2.2.	In vivo Ergebnisse	82
5.2.2.1.	Makroskopische Beurteilung und freie mikrochirurgische Transplantation	82
5.2.2.2.	Selektive Mikroangiographie	84
5.2.2.3.	Histologische und immunhistochemische Untersuchungen	86
6.	Diskussion	89
6.1.	Neovaskularisation präfabrizierter Hautlappen	89
6.1.1.	Zeitliche Entwicklung der Neovaskularisation in präfabrizierten Hautlappen	89
6.1.2.	Formen der Neovaskularisation in präfabrizierten Lappen	94
6.1.3.	Einflußfaktoren auf den Neovaskularisationsprozess in präfabrizierten Lappen	95
6.1.4.	Vorgänge der Gefäßneubildung	99

6.1.5	Quantifizierung der Neovaskularisation im Lappen	99
6.2.	Verwendungsmöglichkeiten von Gefäßstielvarianten zur	
	Lappenherstellung	100
6.2.1.	Arterio-venöser Gefäßstiel mit endständiger Ligatur	101
6.2.2.	Arterio-venöser Gefäßstiel mit endständiger Anastomose	102
6.2.3.	Isolierte arterialisierte venöse Gefäßschlinge	103
6.2.4.	Isolierte arterielle Gefäßschlinge	109
6.2.5.	Arterio-venöser Gefäßstiel mit Gewebe-Expander	109
6.3.	Präfabrikation freier neovaskularisierter Hautlappen in Kombination	
	mit gezüchteten Knorpelzell-Biomaterialkonstrukten	111
6.3.1.	In vitro gezüchtete Knorpelzell-Biomaterialkonstrukte	111
6.3.2.	In vivo präfabrizierte Hautlappen-Knorpelzell-Biomaterialkonstrukte	113
6.4.	Ausblick und Perspektiven in der rekonstruktiven Chirurgie	114
7.	Zusammenfassung	119
8.	Literaturverzeichnis	122
9.	Abbildungsverzeichnis	137
10.	Tabellenverzeichnis	142
11.	Abkürzungsverzeichnis	143
	Danksagung	
	Lebenslauf	

1. EINLEITUNG

Weichteildefekte am Körper treten häufig nach Traumen, thermischen Schädigungen, Tumorsektionen oder angeborenen Fehlbildungen auf. Die chirurgische Wiederherstellung ausgedehnter Hautweichteildefekte und dreidimensionaler Strukturen wie Ohrmuschel und Nase stellen eine besondere Herausforderung für Plastische Chirurgen dar. Bei der Indikationsstellung und Planung rekonstruktiver Eingriffe zur Deckung dieser Gewebsdefekte sind prinzipiell ätiologische Faktoren, Begleitverletzungen, Begleiterkrankheiten sowie funktionelle und ästhetische Langzeitergebnisse zu berücksichtigen. Für die exakte funktionelle und ästhetische Wiederherstellung eines dreidimensionalen Gewebsdefektes ist häufig eine interdisziplinäre Kooperation erforderlich. Neben den medizinischen verschiedenen Fachgebieten können dabei auch Biologie, Chemie, Physik sowie Materialforschung notwendig sein [68, 134, 173, 176].

Der freie mikrovaskuläre Gewebettransfer repräsentiert, insbesondere in der Traumatologie, Orthopädie und Plastischen Chirurgie, eine etablierte Technik zur Deckung von Weichteil- und ggf. auch ossären wie knorpeligen Defekten [18, 133, 176].

In der plastischen und rekonstruktiven Mikrochirurgie stellen präfabrizierte Gewebelappen eine Weiterentwicklung dieser Technik dar. Das Prinzip präfabrizierter Lappen beruht auf der Umwandlung eines zuvor nicht axial perfundierten Gewebeareals in einen axial versorgten Lappen mittels Implantation eines Gefäßstieles. Der größte Vorteil dieser Technik ist, dass präfabrizierte Lappen unabhängig von der anatomischen Blutversorgung, im Hinblick auf die entsprechende Dicke oder Dimension des Defektbereiches an beliebiger Stelle am Körper hergestellt werden können, damit wird die Hebedefekt-morbidität minimiert. Dieses Prinzip ermöglicht dadurch eine deutliche ästhetische Verbesserung der Endergebnisse [1, 109, 133, 137].

Knochen- und Knorpeldefekte, insbesondere in Verbindung mit Hautweichteilverlusten sind für den rekonstruktiven Chirurgen eine große Herausforderung. Prinzipiell stehen als Ersatz für diese Strukturen verschiedene synthetische oder biologische Materialien zur Verfügung. Der Nachteil synthetischer Materialien besteht darin, dass diese potentiell zu toxischen oder allergischen Reaktionen mit konsekutiver Entzündung führen und ggf. auch eine Entfernung des verwendeten Materials erfordern können. Bei der Verwendung von allogenen Gewebe ist die immunologische Unverträglichkeit eine wesent-

liche Gefahr. Zudem ist grundsätzlich auch das Risiko der Übertragung von Infektionskrankheiten gegeben. Ein weiteres Problem ist darin begründet, dass durch Konservierungs- bzw. Sterilisationsverfahren die Gefahr des Vitalitätsverlustes der Transplantate resultieren kann [15, 24, 125, 173].

Bei der Rekonstruktion der oben beschriebenen Defekte werden die besten Ergebnisse bei Verwendung von autologem Material erzielt [2, 105, 156]. Die Anwendung autologer Transplantate ist jedoch anatomisch begrenzt. Um diese Grenzen zu erweitern, wurde ein Konzept entwickelt, das eine Synthese zwischen in vitro Techniken des Tissue Engineering und in vivo Techniken der Lappen-Präfabrikation herstellt [7, 191]. Auf dem Boden dieses Verfahrens können prinzipiell exakte Form, Größe und mechanische Charakteristika der autologen präfabrizierten Transplantate den rekonstruktiven Erfordernissen angepasst werden. Durch die Transplantation solcher präfabrizierten Gewebelappen in mikrochirurgischer Technik könnten komplexe Defektdeckungen vorgenommen werden, die mit den bislang bekannten herkömmlichen Verfahren nicht möglich sind. Grundsätzlich ermöglicht dieses Konzept erstmals, eine Vielzahl von etablierten in vitro Methoden des Tissue Engineering in vivo zu testen und ggf. klinisch anzuwenden.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind uns in der Literatur keine Veröffentlichungen bekannt, die über den klinischen Einsatz von durch Tissue Engineering hergestellten Biomaterial-Konstrukten in Kombination mit neovaskularisierten Gewebelappen zur Defektrekonstruktion berichten.

In der vorliegenden Untersuchung soll einerseits die Neovaskularisation in präfabrizierten Hautlappen und andererseits die Verwendungsmöglichkeit dieser Lappentechnik in Verbindung mit gezüchteten Knorpelzell-Biokonstrukten zur Herstellung freier neovaskularisierter dreidimensionaler Gewebelappen untersucht werden.

2. AKTUELLER STAND DER FORSCHUNGSARBEIT

2.1. Hautdefektrekonstruktion

Die Haut

Die Haut spielt eine ganz wichtige Rolle im Schutz des Körpers vor mechanischen, chemischen oder physikalischen Schädigungen. Sie ist Aushängeschild und Ausdruck unseres Befindens. Die Haut verkörpert Erfolg, Glück, Gesundheit und trägt in hohem Maße zu einer Kommunikation mit der Umwelt und zu einem positiven Selbstwertgefühl bei.

Struktur

Anatomisch kann die Haut im Wesentlichen in drei Schichten eingeteilt werden (*Abb. 1 und Abb. 2*). Die äußerste Schicht, die Oberhaut (Epidermis), entwickelt sich aus dem äußeren Keimblatt, dem Ektoderm. Darunter liegen Lederhaut (Dermis) und Unterhaut (Subkutis), die beide aus dem Mesoderm hervorgehen. Die Epidermis besteht zu etwa 90% aus Keratinozyten und differenziert sich in verschiedene Abschnitte: das Stratum corneum, die Strata lucidum und granulosum, und das Stratum germinativum. Die Dermis besteht aus dem Stratum papillare, das reich mikrovaskularisiert ist und Haarwurzeln, Talg- sowie Schweißdrüsen beherbergt. Das Stratum papillare ist Träger des Nervensystems der Haut und enthält zusätzlich mobile Zellen des Entzündungs- und Immunsystems (Makrophagen, Mastzellen, Lymphozyten). Die Subkutis besteht zum größten Teil aus Fettzellen und Bindegewebe (*Abb. 1*). Die Festigkeit der

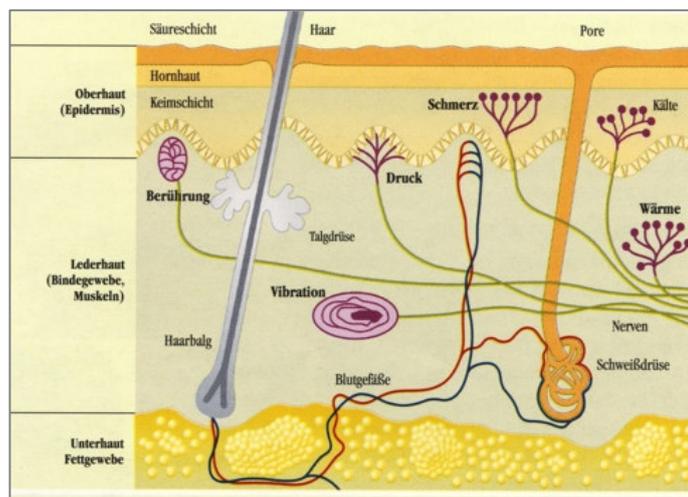


Abb. 1. Aufbau der Haut (nach der Vereinigung der Deutschen Plastischen Chirurgen; 2002)

Die Subkutis besteht zum größten Teil aus Fettzellen und Bindegewebe (*Abb. 1*). Die Festigkeit der

Verbindung zu der darunter liegenden Körperfazie bestimmt im wesentlichen die Verschiebbarkeit der Haut. Die Subkutis umfasst beim Menschen etwa die Hälfte bis zwei Drittel der Gesamtfettmasse [115, 203].

Blutversorgung der Haut und Hautlappen

Das Gefäßsystem der Haut besteht aus Arterien, Venen, Blutkapillaren und Lymphgefäßen. Dieses Gefäßnetz bildet ein tiefes (fasziales), ein oberflächliches (kutanes) und ein subepitheliales Gefäßnetz, welches durch perforierende, senkrecht verlaufende Arterien und Venen die jeweilige Hautschicht versorgt (*Abb. 2*). Obwohl der Anteil am Gesamtblutfluss mit ca. 4,5% relativ gering ist, regelt die Haut jedoch durch Spasmen und Dilatationen der Mikrozirkulation sowie durch arterio-venöse Shunts in den Hautschichten im wesentlichen die Körpertemperatur und in gewissem Maß den Blutdruck. Der minimale Blutfluss für das Hautüberleben wird auf etwa 0,04 ml Blut/min für ein Gramm Hautgewebe geschätzt [163, 179].

Die Art der Gefäßversorgung in einem solchen Hautlappen kann nach McCarthy 1990 [121] in vier Gruppen verteilt werden (*Abb. 3*). Die erste Gruppe ist der randomisierte Hautlappen, in dem Äste der größeren Gefäße sich direkt in dem darüber liegenden dermalen Gefäßplexus fortsetzen. Die zweite Gruppe ist der fasziokutane Hautlappen, in dem große Gefäße in den tiefen intermuskulären Septen liegen und von hier Äste an die Faszie und das darüber liegende sub-

kutane Gewebe abgeben. Ein typisches Beispiel für diesen fasziokutanen Hautlappen ist der Radialis Lappen, der von Yang und Mitarbeiter im Jahr 1981 [206] entwickelt wurde. Der arterielle Hautlappen bildet die dritte Gruppe, in der die septokutanen Arterien parallel zur Haut verlaufen und wie in der Art eines Tannenbaums Seitenäste abgeben. Klassische Beispiele für diese Art sind der von Bakamijan 1965 beschriebene Deltopectoralappen [9] und der von McGregor und Mitarbeiter 1972 vorgestellte Leistenlappen [122]. Die letzte Gruppe ist der myokutane Hautlappen, bei dem große Gefäße im Mus-

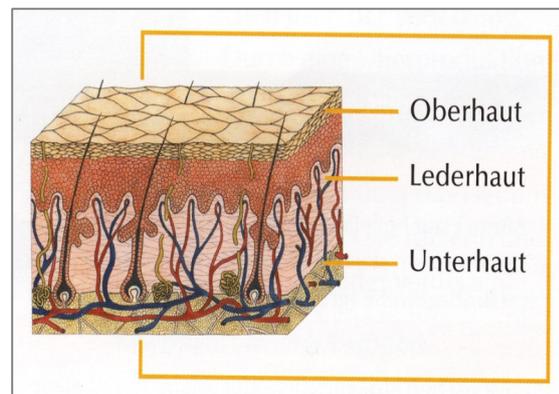


Abb. 2. Drei Schichten der Haut und Blutversorgung (Vereinigung der Deutschen Plastischen Chirurgen; 2002)

kel verlaufen und von hier viele kleine perforierende Gefäße abgeben, welche die darüber liegende Faszie und Haut versorgen. Typische Beispiele für dieses Muster sind der von Baudet und Mitarbeiter 1976 berichtete Latissimus dorsi Hautmuskellappen [12] und der von Pennington und Mitarbeiter 1982 beschriebene rektus abdominis Hautmuskellappen [147].

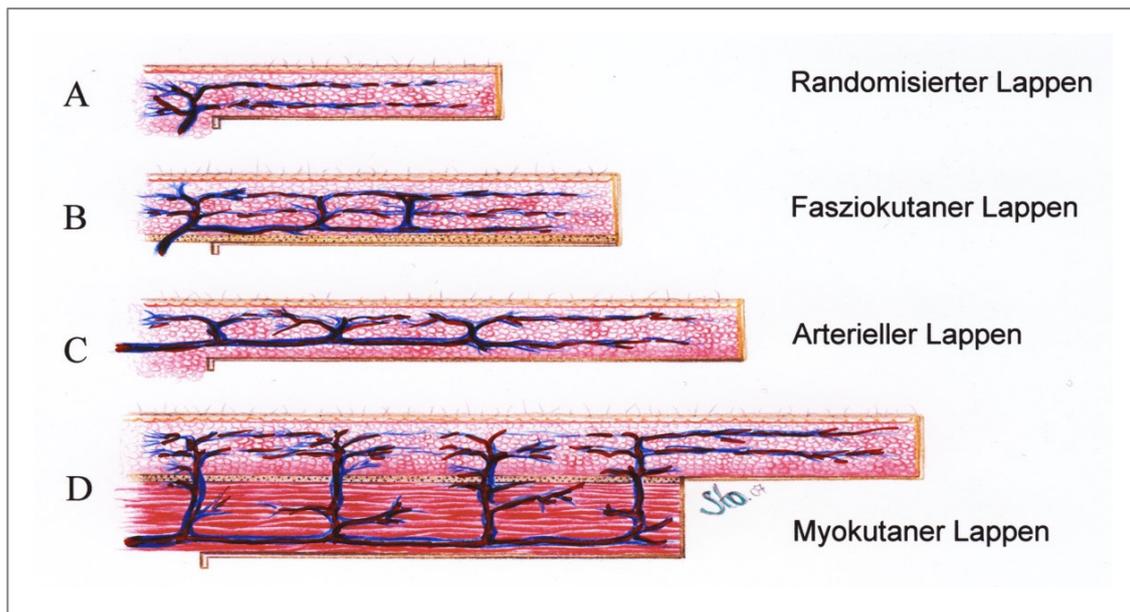


Abb. 3. Vier Gruppen der Blutversorgung der Haut nach McCarthy (1990).

Innervation

Die Innervation der Haut erfolgt durch sensible und vegetative Nerven. Die vegetativen Nerven reichen ähnlich den Blutgefäßen in die Subkutis und Lederhaut. In der Epidermis sind zusätzlich noch sensible Nerven. Beide Nervenarten stellen das Tastorgan der Haut dar und lassen sich morphologisch in Druck- und Berührungsempfänger, Schmerzrezeptoren und Temperaturrezeptoren einteilen [163, 203]. (Siehe Abb. 1)

Hautdefektdeckung in der rekonstruktiven Chirurgie

Hautweichteildefekte am Körper können durch verschiedene Ursachen wie Trauma, Unfall, thermische Schädigung, Tumor, Krankheit wie Diabetes mellitus, arterieller Verschluss oder angeborene Fehlbildung entstehen. Sie stellen ein ausgeprägt belastendes Problem für Betroffene mit sozioökonomischen und beruflichen Folgen dar.

Die chirurgische Rekonstruktion von Hautweichteildefekten, insbesondere bei ausgedehnten Defekten mit freiliegenden tiefen Strukturen wie Gelenken, Knochen oder Sehnen ist schwierig. Bei der Wiederherstellung derartiger Hautdefekte müssen zusätzlich sowohl funktionelle Erfordernisse als auch ästhetische Bedürfnisse durch die Verwendung von geeigneten Materialien hinsichtlich Textur, Farbe, Dimension, Dicke und Beschaffenheit entsprechend dem benachbarten Hautgewebe der Defekte von Plastischen Chirurgen berücksichtigt werden. Hautdefektrekonstruktionen stellen deshalb eine große Herausforderung in der rekonstruktiven Chirurgie dar.

Zur form- und funktionsgerechten Rekonstruktion von Hautweichteildefekten am Körper steht heute ein großes Spektrum verschiedener Wiederherstellungsverfahren, entsprechend der Größe und Beschaffenheit der jeweiligen Körperregion wie Hauttransplantat, lokale Hautlappen und Fernhautlappen zur Verfügung.

- Hauttransplantate

Chirurgen des 19. Jahrhunderts wie Bünger (1823) in Marburg, Reverdin (1869) in Paris haben kleine dünne Hautteile, die in erster Linie aus Epidermis und geringen Koriumanteilen bestanden, auf granulierende Wundflächen übertragen [68]. Als nächstes haben Pjassetzki (1870) in Moskau, Wolfe (1875) in Glasgow, Thiersch (1886) in Leipzig Hauttransplantationen in der Klinik durchgeführt. Die Verwendung von Spalthauttransplantaten durch Blair und Brown (1929) sowie die Herstellung eines Dermatomes von Padgett und Hood (1939) verhalf diesem Verfahren zu einer größeren Verbreitung in der Entwicklung der Hauttransplantation [26, 38, 68].

Das Spalthauttransplantat lässt sich aus fast allen Körperregionen gewinnen und zeigt eine gute Anheilungstendenz. Die Spenderregion wird selbst reepithelisiert und heilt spontan. Ein Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, dass die Indikation zwingend mit einem gut vaskularisierten Wundbett verbunden ist. Diese Prozedur ist deshalb bei den stark traumatischen Wunden, wie z. B. Dekubitalulkus oder bei freigelegten Sehnen, Knochen, Knorpel usw. in der Regel nicht indiziert. Ein weiteres Problem bei Spalthaut-

transplantaten stellt die relativ große Schrumpfungstendenz und die Ausbildung von Hyperkeratosen am Rande des Transplantats, insbesondere an hohen mechanischen Belastungsregionen wie an der Fußsohle dar. Wegen der häufig abweichenden Haut ist dieses Verfahren kosmetisch nicht zufriedenstellend.

- Lokale Hautlappenplastiken

Hautlappenplastiken umfassen einen Abschnitt der Haut und des Unterhautgewebes mit ausreichend zu- und abführender Blutversorgung, welche freipräpariert, von seiner Unterlage abgehoben und an einer neuen Empfangsstelle transplantiert werden. Die Blutversorgung (Lappenstiel) spielt eine entscheidende Rolle für die Lappenvitalität und muss deshalb die wichtigsten Blutgefäße (mit oder ohne Nerven) des Hautlappens enthalten [26].

Aufgrund des anatomischen Aufbaus des Hautweichteilmantels wurden lokale Hautlappenplastiken schon sehr früh vor allem in der Rekonstruktion von kleinen und mittleren Hautgewebsdefekten eingesetzt [105]. Grundsätzlich können lokale Hautlappen in Verschiebelappen, Rotationslappen, Transpositions-lappen und Insellappen gegliedert werden. Eine zusätzliche Technik zur lokalen Hautdefektdeckung stellt die Hautexpansion dar.

Verschiebehautlappen

Verschiebehautlappen werden als U-Plastik häufig am Rumpf oder den Extremitäten verwendet. Das Ulkus wird zuerst in einem quadratischen Defekt umgeformt. An der Seite, wo die Haut am beweglichsten ist, wird ein Hautstreifen gebildet und nach vorne verschoben. Als eine modifizierte Art des Verschiebehautlappens wurde die Methode des Raupenlappens beschrieben (Abb. 4). Bei dieser Technik wird ein Hautlappen von entsprechender Länge in der Richtung der Längsachse des Defektes umschnitten und abgehoben. Der Lappen wird dann umgeklappt und sein Ende zusammengenäht. In der zweiten Sitzung wird der

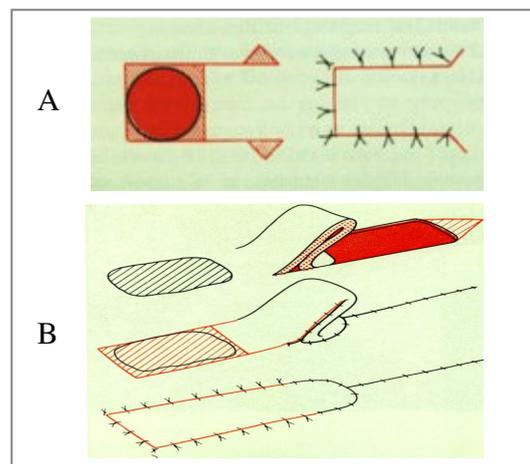


Abb. 4. Verschiebehautlappen (A) und Raupenlappen (B) nach Burian [1978]

Lappen aufgeklappt und über den Defekt ausgebreitet, um den Defekt zu verschließen. Diese Modifikationstechnik wird jedoch heute kaum angewendet [26, 104].

Rotationslappen

Bei Rotationslappen wird ein Hautbereich rotiert, um einen Defekt zu verschließen. Dieses Grundprinzip wird wirkungsvoll an Stellen elastischer Haut und häufig im Gesicht und am Hals angewendet. Der Rotationslappen umschreibt einen Bogen von etwa 180° , wobei die Basis doppelt so breit wie der Defekt sein sollte. Der ganze Bogen wird minimiert und die Haut nach vorn verlagert. Um einen größeren oder mehr rechteckigen Defekt zu verschließen, können doppelte Rotationslappen verwendet werden (Abb. 5).

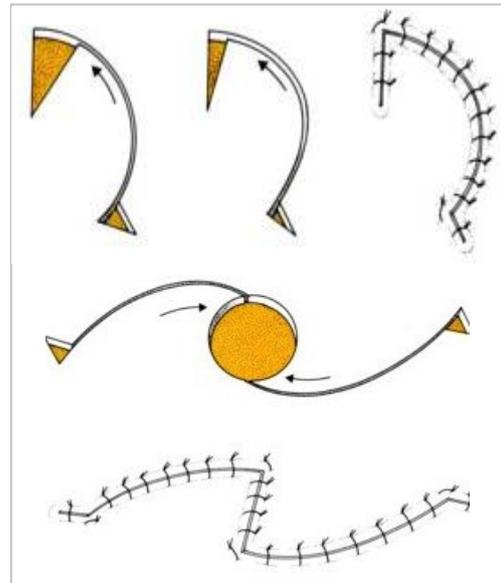


Abb. 5. Rotationslappen
(nach Kaufmann, 1987)

Transpositions-lappen

Transpositions-lappen dienen dazu, einen Defekt durch einen Lappen aus den angrenzenden Geweben zu decken. Diese Technik kann zur Rekonstruktion kleiner bis mittelgroßer Defekte in allen Körperregionen angewendet werden. Der Transpositions-lappen kann nach Bedarf unterschiedliche Formen besitzen. Es ist wichtig, die Operation exakt zu planen, damit der Hebedefekt möglichst primär verschlossen werden kann.

Bei der einfachsten Form des Transpositions-lappens wird der Hautlappen um etwa 90° verlagert und der Hebedefekt primär verschlossen. Der doppelte Transpositions-lappen erlaubt die Verlagerung eines verhältnismäßig großen Gewebestücks um 180° , während der Stiel nur um 90° gedreht wird (Abb. 6).

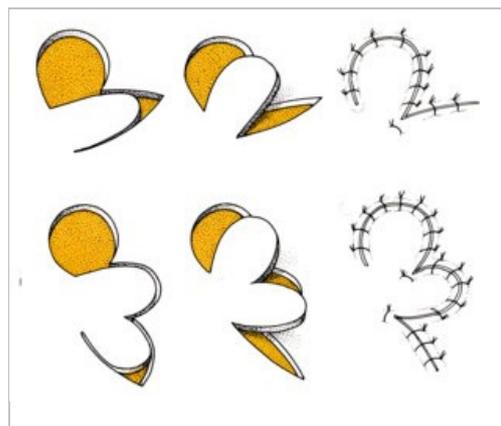


Abb. 6. Transpositions-lappen
(nach Kaufmann, 1987)

Der Hauptnachteil des doppelten Rotationslappens liegt darin, dass eine große und längliche Narbe entsteht, weshalb dieser Lappen klinisch seltener

angewandt wird. Ein Beispiel eines doppelten dreieckförmigen Transpositionsflappens sind Z-Plastiken, bei dem zwei dreieckige Hautlappen gegeneinander versetzt werden. Mittels Z-Plastik können kontraktile Narben um bis zu 75% verlängert werden. Zudem wird die Richtung des Narbenverlaufes auch geändert. Als Alternative zu Transpositionsflappen werden Brückenlappen über die Schädelwölbung zum Ersatz der Hautbedeckung des Kinns verwandt, bei denen jeder Lappenstiel ein temporales Gefäßbündel enthalten kann [26, 104].

Ähnlich wie bei Verschiebelappen und Rotationslappen können die Transpositionshautlappen auch keine definierte Gefäßversorgung besitzen, sondern über den dermalen und subkutanen Gefäßplexus im Sinn eines „random-pattern flap“ ernährt werden. Um eine volle Durchblutung des Transplantates und somit ein komplikationsloses Anwachsen sicherzustellen, muss ein spezielles Längen- und Breitenverhältnis des Lappens eingeplant werden. Dieses Verhältnis variiert durch die unterschiedlichen Ausmaße der Blutversorgung nach jeweiliger Körperregion und dürfte im Prinzip 3 : 1 im Bereich des Gesichtes und 2 : 1 im Bereich des Rumpfes und der Extremitäten nicht übersteigen [26, 66].

Insellappen

Der Begriff „Insellappen“ wurde erstmalig von J. F. Esser 1918 nach seinen anatomischen Untersuchungen von verschiedenen gefäßgestielten Lappen im Kopf-Hals-Bereich genannt. Littler veröffentlichte 1954 seine Methode des gestielten Insellappens zur neurovaskulären Fingertransposition. Im gleichen Jahr stellte E. Moberg auch seinen neurovaskulären Insellappen zur Resensibilisierung des Daumens vor (original zit. bei Geishauser 1995).



Abb. 7. Plantaris medialis Insellappen

Insellappen sind Hautlappen, die nur an einem gebildeten Gefäßstiel hängen. Diese Lappen werden dann zur Defektdeckung eingeschlagen. Eine Modifikation dieser Methode stellt der Insellappen mit subkutanem Stiel dar [26]. Bei dieser modifizierten Technik wird die Epidermis am Lappenstiel entfernt und der subkutane Stiel in der Richtung

Ihrer Blutversorgung hin so weit abpräpariert, dass der Insellappen danach zur Defektdeckung transponiert werden kann.

Insellappen erfordern in der Regel einen axialen Gefäßstiel oder ein ausreichendes Gefäßnetz im Subkutangewebe, wie es z. B. im Gesicht, an der Hand oder am Fuß vorhanden ist. Im Gesicht können Insellappen von beträchtlicher Größe an der Stirn, der Schläfe und am Scheitel (Arteria temporalis) gebildet werden. An der Hand und am Fuß sind genaue Kenntnisse über die Anatomie der Gefäß- und Nervenversorgung sowie exakte Operationstechniken erforderlich, um eine erfolgreiche Durchführung zu ermöglichen. In diesen Regionen können Insellappen im Bereich der Hohlhand und Handrücken bzw. Fußsohle und Fußrücken gehoben werden. Alternativ kann ein Finger oder eine Zehe filetiert und diese Weichteile sodann als Insellappen verwendet werden. Beispiele von Insellappen in diesen Regionen sind der neurovaskuläre Unterarm-lappen, versorgt durch das radiale Gefäßbündel, und der neurovaskuläre plantaris medialis Lappen (*Abb. 7*), die zur Wiederherstellung von Defekten an der Hand oder der Ferse angewandt werden [68, 164].

Hautexpansion

Wenn ein Gewebeverlust nicht durch Mobilisierung des benachbarten Gewebes gedeckt werden kann oder der Verschluss mit einem lokalen Lappen zu einer störenden Narbenbildung am Hebedefekt führt, kann die Gewebsvergrößerung durch Hautexpansion eine gute Lösungsalternative sein. Durch die Hautexpansion können große Defekte bei idealer Anpassung der Farbe, Dicke und Hautbeschaffenheit primär geschlossen werden. Nachteile dieser Prozedur bestehen darin, dass der Expander unbedingt über einer festen, flachen Oberfläche wie dem Schädel, der Stirn oder dem Nacken liegen muss. Außerdem sind die Notwendigkeit von zwei Eingriffen und die hohe Komplikationsrate bei der langsamen Hautexpansion die größten Nachteile dieses Verfahrens [8, 105, 136].

- Fernlappenplastiken

Die Einführung von Fernlappen zur Weichteilrekonstruktion leitete eine neue Ära in der Wiederherstellungschirurgie ein. Hamilton beschrieb 1854 erstmals die erfolgreiche Rekonstruktion von Hautweichteildefekten am Bein mit einer gekreuzten Lappenplastik. 1874 wandten Billroth und Czerny dieses Verfahren an. Unabhängig voneinander erkannten Filatov in Russland (1917) und Gillies in England (1920), dass durch das Ver-

nähen der Wundränder der Lappenstiele bei diesem oben genannten Verfahren das Risiko der Infektionen am Stiel deutlich verringert wurde [68].

Mit diesen sogenannten „Rundstiellappen“ ist es möglich, Gewebe, z.B. am Bauch oder Thorax, vor der Transplantation zunächst ortständig zu präformieren. Bei der Verwendung von Rundstiellappen als Fernlappen müssen diese zunächst auf einen Zwischenträger, meist den Unterarm verpflanzt werden, um letztendlich den Hautweichteildefekt am Fuß, distalen Ende des Unterschenkels oder im Gesicht decken zu können. Der Begriff „cross foot“ wurde erstmalig von Mir 1954 beschrieben, der den Weichteillappen der nichtgewichttragenden Sohle des Mittelfußes zur Sohlenweichteilrekonstruktion des verletzten Fußes verwendete [68,127]. Die Entwicklung der axialen Lappen in Verbindung mit mikrochirurgischen Techniken hat in den letzten Jahrzehnten (seit 1973) Deckungsmöglichkeiten von Fernlappen revolutioniert.

Fernlappenplastiken können in direkte italienische Stiellappen, Rundstiellappen und freie axiale Lappen unterteilt werden.

Direkter Italienischer Stiellappen

Der direkte Italienische Stiellappen wurde ursprünglich aus dem Arm gebildet, kann jedoch von jeder Körperregion entnommen werden (*Abb. 8*). Voraussetzung für die Lappenplanung ist, dass der Lappen dem Defekt direkt angenähert werden kann; so kann z.

B. ein Nasendefekt mit einem Lappen aus dem Arm rekonstruiert werden.

Wenn der Defekt sich an einer Extremität befindet, muss diese Prozedur sorgfältig geplant sein. Hierfür ist es notwendig, die beiden Körperteile spannungsfrei zu fixieren und ohne Gewalt dem Rumpf oder einem anderen Körperglied anzulegen. Das beste Verhältnis zwischen Länge und Breite eines solchen Lappens ist 2 : 1. Der

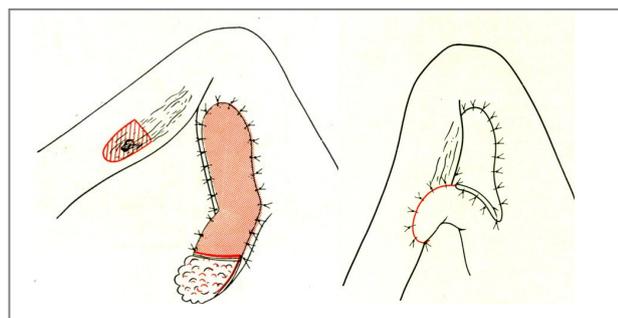


Abb. 8. Italienischer Lappen am Oberschenkel (Burian 1978)

offene Teil des Stieles kann nach der Lappenhebung durch ein Hauttransplantat gedeckt werden, oder ein Rundstiellappen zur Vermeidung einer Infektion gebildet werden [26, 104].

Eine Modifikation dieses Lappens ist der gedoppelte Lappen. Dieser Lappen wurde von zwei Italienischen Lappen, wie z. B. an der Oberarm-Thorax oder Oberarm-Unterarm Region, gebildet. Bei dem Oberarm-Thorax gedoppelten Lappen wird der thorakale Stiel nach 14 Tagen durchtrennt und danach ein Defekt im Gesicht rekonstruiert [26].

Rundstiellappen (Filatov, Gillies)

Bis zum Jahre 1973 war der Rundstiellappen die wichtigste Methode der Fernlappenplastiken (Abb. 9).

Prinzipiell werden Rundstiellappen als Brückenlappen und aus Haut-Fett-Gewebe gebildet, deren Ränder zusammengenäht werden und so ein Rohr bilden. Beim Lappendesign soll das Verhältnis von Länge zu Breite 2 : 1 bis 3 : 1 sein. Die Achse des Lappens sollte an der Entnahmestelle entlang der Blutströmung liegen, wobei die arterielle und venöse Durchblutung berücksichtigt werden sollte. Der Hebedefekt kann nach Hautmobilisation in üblicher Weise durch eine primäre Naht verschlossen werden. Neben oberflächlichen Wiederherstellungen der Hautweichteildefekte können Rundstiellappen alternativ für die Obliteration von Höhlen mittels der Epidermisentfernung angewandt werden [162].

Rundstiellappen sind wegen ihrer unvollkommenen Sensibilität jedoch sehr vulnerabel.

Druck, Biegen oder Verdrehen können die Blutzufuhr verlegen und dadurch eine partielle oder totale Nekrose verursachen. Außerdem können Rundstiellappen bei besonders ausgedehnten Hautweichteildefekten häufig nicht genügend Gewebe zur Defektdeckung liefern. Zusätzlich beträgt die Behandlungsdauer

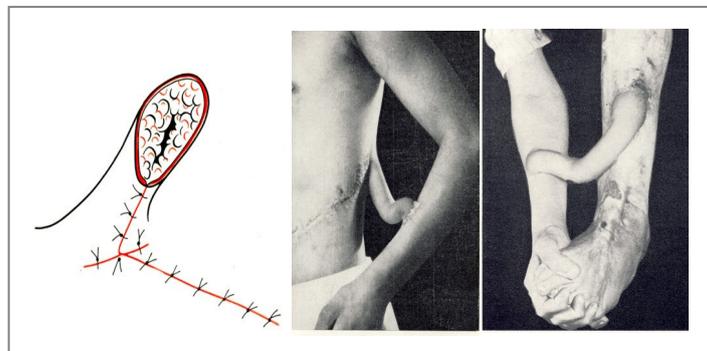


Abb. 9. Rundstiellappen zur Unterschenkelrekonstruktion (Burian, 1978)

der Gewebetransplantation, z. B. am Bauch oder Thorax zur unteren Extremität, von der ersten Operation bis zum endgültigen Defektverschluss durchschnittlich 5,8 Monate, mit neun Narkosen und einer Anästhesiedauer von insgesamt 21 Stunden. Entsprechend dem Verfahren sind die Behandlungskosten auch relativ hoch [68].

Die italienischen Lappen und Rundstiellappen sind für Patienten, Ärzte und Pflegepersonal außerordentlich belastend. Diese Lappen stellten jedoch über ein Jahrhundert bis zur Mikrochirurgieentwicklung mit freien Lappentransplantationen (1973) die Grenzen der rekonstruktiven Chirurgie bei ausgedehnten Hautweichteildefekten am Fuß, Unterschenkel und im Gesicht dar. Heute werden sie wegen der bekannten Nachteile nur im Ausnahmefall verwendet werden [68].

Freie mikrovaskuläre Lappentransplantation

Die klinische Anwendung von freien Gewebslappen unter Verwendung mikrochirurgischer Techniken revolutionierte die rekonstruktive Chirurgie von ausgedehnten Hautweichteildefekten am Körper. Voraussetzung für die erfolgreiche mikrovaskuläre Hautlappentransplantation ist die Existenz eines anatomisch definierten Gefäßstieles zur Blutversorgung des Transplantatgewebes [133].

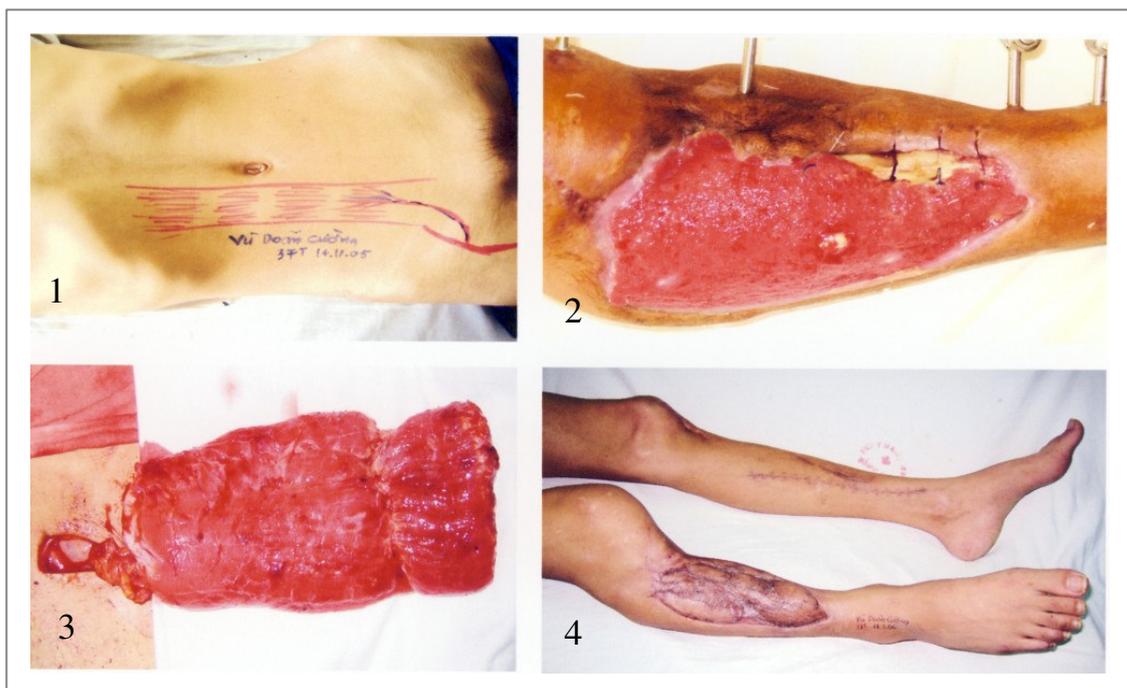


Abb. 10. Rekonstruktion eines ausgedehnten Hautweichteildefektes mit offener Tibia-Fraktur am Unterschenkel durch einen freien mikrochirurgischen VRAM-Lappen: Lappendesign (1); Nach der Abpräparation (2); präoperative Bilder (3) und 12-Monate postoperative Ergebnisse (4).

Der erste mikrochirurgische Eingriff wurde wahrscheinlich von T. Sämisch (Bonn, 1876) mit einer binokulären Vergrößerungsvorrichtung für die Chirurgie durchgeführt. Zwanzig Jahre später stellte Axenfeld (1899) ein bewegliches Lupensystem mit Stirnbandbefestigung und 5- bis 6-facher Vergrößerung vor. Wegen seines erheblichen Gewichts hat dieses Lupensystem keine weitere Verbreitung gefunden. Im Jahr 1912 entwickelte Rohr (Jena) die ersten Lupenbrillen mit zweifacher Vergrößerung, die von der Firma Carl Zeiss hergestellt wurden, und vor allem in der Ophthalmologie benutzt wurden (originales Zitat bei Weber 1993).

Bereits 1921 wandten Nylen und Holmgren (Stockholm) ein binokulares Mikroskop mit etwa 10-facher Vergrößerung bei Operationen am Mittelohr an. Die Benutzung vergrößernder Optiken ermöglichte die präzise Manipulation kleinerer anatomischer Strukturen. Allerdings vergingen noch vierzig Jahre, bis Jacobson und Suarez (1960) erstmals Gefäße der Größe von Millimetern mit dem Mikroskop Opmi 1 erfolgreich anastomosierten. Es fehlte zunächst entsprechende mikrochirurgische Instrumente, weshalb am Anfang Uhrmacherpinzetten genommen und Haare mit metallinisierten Spitzen als Fäden verwendet wurden [68]. Die Mikrochirurgie der peripheren Nerven ist mit den Namen von James Smith, Chaffee und Numoto Anfang der 60er Jahre verbunden und durch die späteren Arbeiten von Samii geprägt [202].

Durch die Optimierung der mikrochirurgischen Instrumente und Techniken wurde die Anastomosierung kleiner Gefäße ermöglicht [18]. Im Jahr 1965 gelang Komatsu und Tamai [102] die erste Replantation eines komplett abgetrennten Daumens durch Verwendung mikrochirurgischer Techniken, welche erst im Jahr 1968 publiziert wurde. Den ersten freien experimentellen Zehentransfer beim Rhesusaffen führte Harry Buncke (1966) erfolgreich durch und verfolgte danach mit großem Interesse freie mikrochirurgische Gewebetransplantationen [25].

Nach diesen bekannten Publikationen wurde der mikrovaskuläre freie Lappentransfer klinisch an verschiedenen Zentren begonnen. Im Jahr 1969 berichtete Cobbett über den freien klinischen Zehentransfer [37]. Im September 1972 wurde ein freier behaarter Skalplappen von einer Temporalregion auf die Gegenseite mit Gefäßanschluss von Harii in Tokio durchgeführt [75]. Ein Jahr später publizierten Daniel und Taylor (1973) sowie O'Brien den erfolgreichen freien Leistenlappentransfer zur Hautweichteilrekonstruktion am Fuß [41, 139]. Dieser freie Leistenlappen hatte jedoch wesentliche Nachteile, aufgrund seines anatomisch variablen Gefäßstiels, war er nur teilweise erfolgreich und führte deshalb dazu, nach anderen Lappenalternativen zu suchen.

Im Jahr 1975 beschrieben McGraw und Furlow den Dorsalis pedis Lappen als einen gestielten oder freien Faszio kutanlappen zur Defektdeckung [122]. Im gleichen Jahr verwendeten Harii, Ohmori und Torii [76] den neurovaskulären Muskellappen des Musculus gracilis erstmalig als mikrovaskulären Muskeltransfer zur funktionellen Wiederherstellung einer Gesichtslähmung. In der Folgezeit wurden verschiedene freie Lappen als Muskel-, Haut-, und Knochenlappen publiziert, wie der Latissimus dorsi Muskellappen (Baudet und Mitarbeiter 1976), Radialis Hautlappen (Yang und Mitarbeiter 1981), Rectus abdominis Muskellappen (Pennington und Mitarbeiter 1982), Scapular und Parascapular Hautlappen (Dos Santos 1984), laterale Oberarmhautlappen (Katsaros und Mitarbeiter 1984), Fibularknochenlappen (Taylor und Mitarbeiter 1975) und Beckenkammknochenlappen (Taylor und Mitarbeiter 1979) [66].

Freie Lappen können entweder nur aus einem Gewebetyp wie Haut, Faszie, Muskel gebildet werden oder sind aus mehreren Gewebsbestandteilen zusammengesetzt. Dazu gehören die freien fasziokutanen Lappen, die freien myokutanen Lappen, die freien osteomyocutanen Lappen sowie deren zahlreiche Abwandlungen [18, 68, 133]. Es zeigte sich nach Einführung der freien Lappen, dass im Vergleich zu Rundstiellappen freie mikrochirurgische Hautlappen folgende Vorteile haben:

- weniger Zeitaufwand, Komplikationen und Kosten für den Patienten.
- fast unabhängig von lokalen Gegebenheiten zu transplantieren.
- Gewebe mit spezifischen Eigenschaften (z. B. haartragende Haut, funktionelle Muskel, Knochen usw.) kann verpflanzt werden.
- eine Frühmobilisation ist möglich.
- Relative kurze postoperative Ruhigstellung, dadurch ist das Verfahren auch für ältere Patienten geeignet.
- unauffälligerer Hebedefekt, da dieser meist an weniger exponierter Lokalisation liegt.

Als Nachteile dieser Methode gelten die längere Operationszeit und ein erhöhtes Thromboserisiko im Bereich des Gefäßanschlusses. Dieses Thromboserisiko kann ggf. durch entsprechende Erfahrung der Mikrochirurgen deutlich verringert werden. Für erfahrene Mikrochirurgen haben axiale und freie Lappen fast die gleiche Sicherheit [66].

Aufgrund technologischer Fortschritte im Bau von Mikroskopen, mikrochirurgischer Instrumente und entsprechender klinischer Erfahrung stellen freie Hautgewebslappen heute bei ausgedehnten Hautweichteildefekte eine absolute Indikation dar, insbesondere im Bereich der Hand, des Fußes, Unterschenkels und des Gesichts.

2.2. Präfabrizierte Hautlappen

Die anatomisch vorhandenen Hautlappen am Menschen stellen jedoch nicht immer die ideale Lösung für einen betroffenen Defekt dar. Die Verfügbarkeit von Gewebeblöcken mit entsprechendem anatomischen Gefäßverlauf sind am menschlichen Körper limitiert oder können durch vorausgegangene Verletzungen reduziert sein. Häufig ist die Entnahme solcher Transplantate nur unter Hinterlassung eines funktionell oder ästhetisch ungünstigen Hebedefektes möglich (*Abb. 11*). Darüber hinaus ist die Rekonstruktion eines sehr ausgedehnten Weichteildefektes am Unterschenkel, Fuß, an der Hand oder im Gesicht mit Verwendung freier Lappen aufgrund anatomisch definierter Lappenblutversorgung ungünstig. Die chirurgischen Anforderungen zur Wiederherstellung von dünnen Strukturen, wie z. B. im Gesicht, an der Hand, am Fuß oder dreidimensionalen Strukturen wie dem Ohr oder der Nase, sind wegen des meist

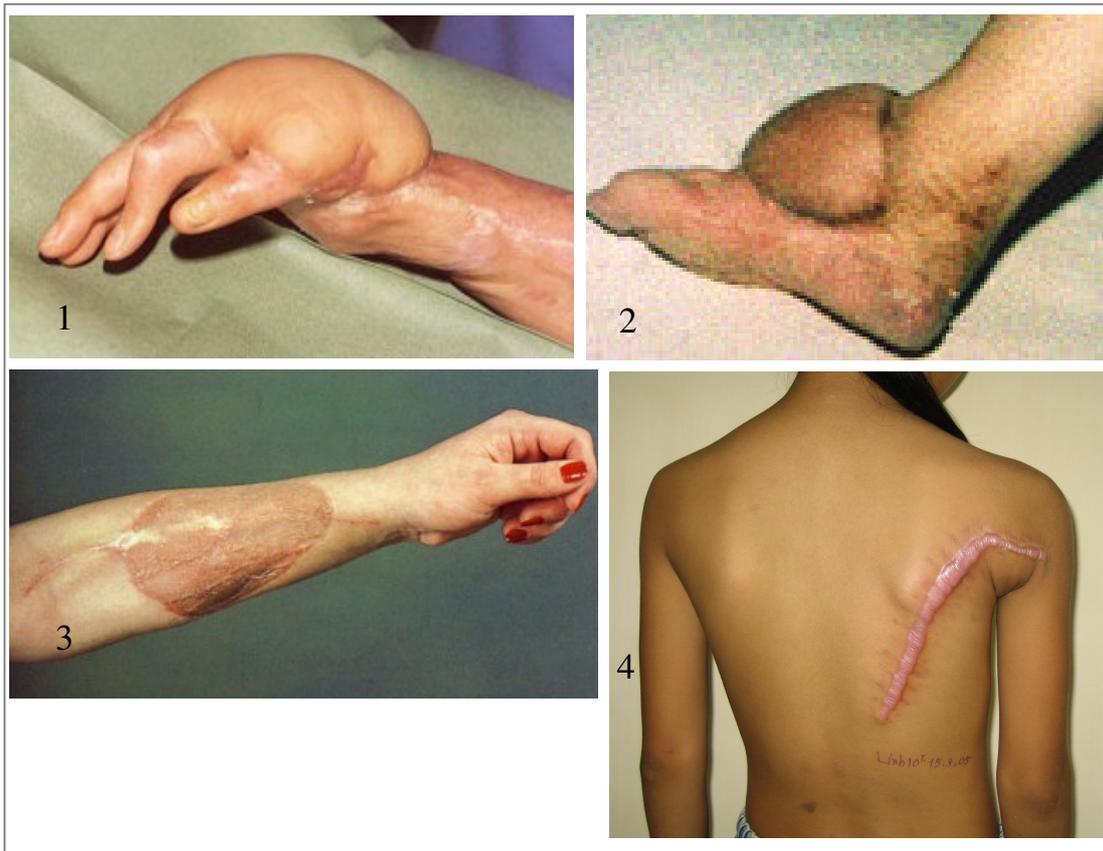


Abb.11. Ungünstige Ergebnisse nach freier Lappentransplantation: (1 und 2) Lappen war zu dick und plump; (3 und 4) Ausgeprägte Spendermorbidity.



Abb.12. Schwierige Herausforderungen für die chirurgische Rekonstruktion Ausgedehnter Gewebsverlust des gesamten posterioren Unterschenkels (1); Angeborene Ohrmalformation (2).

dicken Subkutangewebes zu plump und deshalb auch nicht ideal (Abb. 11).

Forschritte in der Plastischen und Wiederherstellungschirurgie, insbesondere durch die Präfabrikation von axial perfundierten Gewebelappen ermöglichten es, dieses klinische Problem zu reduzieren. Die Grundidee präfabrizierter Lappen ist es, gestielte Lappen unabhängig vom anatomischen Gefäßverlauf, in entsprechenden Regionen durch die Implantation eines Gefäßträgers herzustellen. Durch diese Technik können einfache freie Hautlappen oder freie kombinierte Transplantate mit entsprechend niedriger Hebedefekt morbidity und entsprechend den Erfordernissen des klinischen Bedarf gebildet werden. Damit ist die Präfabrikation sehr großer Hautlappen oder feiner dreidimensionaler Strukturen wie eines Ohres oder einer Nase mit Hilfe entsprechender Gerüstsubstanzen denkbar (Abb. 12). Diese präfabrizierten Lappen werden dann in üblicher Weise gestielt oder mit mikrovaskulärem Anschluss frei transplantiert.

Prinzipiell lassen sich vier Möglichkeiten der präfabrizierten Hautlappen unterscheiden:

- Präfabrizierung durch Delay-Verfahren: (Lappenumschneidung)

Dieses Verfahren wurde entwickelt, um komplett fehlende Körperteile wie Nase, Ohr, Knochen oder Knorpel an einer fern vom Defekt liegenden Region vorzuformen. Diese präfabrizierten Gewebslappen werden danach "en-bloc" in einem zweiten Operationsschritt an das Empfangsareal mikrochirurgisch oder gestielt transplantiert.

Das Delay-Verfahren wurde experimentell und klinisch von zahlreichen Autoren beschrieben. Am experimentellen Modell des Kaninchens führten Hörl und Mitarbeiter [91] im Jahr 1994 die Implantation eines porösen Blockes Proplast II in einen Leistenlappen mit direktem Kontakt zur Arteria und Vena epigastrica superficialis durch. Nach 6 Wochen wurde der kombinierte Proplast II Block-Leistenlappen gehoben. In der Zwischenzeit waren von A. V. epigastrica superficialis ausgehend, Bindegewebe und Gefäße in den porösen Kunststoffblock eingewachsen. In einem zweiten Operationsschritt wurden Hauttransplantate auf den vaskularisierten, präfabrizierten, gefäßgestielten Kunststoffblock aufgebracht. Es zeigte sich, dass Hauttransplantate auf einem zuvor neovaskularisierten und durch einen definierten Gefäßstiel durchbluteten porösen Kunststoff angehen und überleben können. Der poröse Kunststoff erfüllt dabei eine Doppelfunktion: Einerseits formgebendes und tragendes Gerüstmaterial und andererseits Ernährungs- und Aufnahmelager für deckende Hauttransplantate.

In dem klinischen Anwendungsbereich fallen auch Lappenplastiken, bei denen durch Transplantation von Spalt- oder Vollhaut auf die Unterseite des Lappens ein bestehender Gewebelappen zum zusammengesetzten Transplantat präfabriziert wird, wie z. B. die intraorale Epithelschicht imitiert werden sollte. Ein ausgezeichnetes Beispiel für dieses Konzept wurde von Holle und Mitarbeitern 1996 [87] vorgestellt, in dem sie osteointegrierte Implantate in einen osteokutanen Skapularlappen für die Oberkieferrekonstruktion eingebracht haben. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass unmittelbar nach Transplantation dieses präfabrizierten Lappens mit der Anpassung der Zähne begonnen werden und damit in kürzester Zeit postoperativ eine Kaufunktion wiederhergestellt werden kann [67].

Bei diesem Verfahren erfolgte eine verstärkte Blutzufuhr und Zirkulation im gehobenen Hautlappen über die verbleibende Lappenstielung, daraus resultierte eine signifikant höhere Vitalität als in einem nicht chirurgisch konditionierten Gewebelappen.

- Präfabrizierung durch Präexpansion:

Bei dieser Prozedur wird prinzipiell ein axial gestielter Hautlappen präexpandiert, so dass die Fläche dieses Hautlappens erheblich vergrößert werden kann. Die Präexpansion durch Expander beruht auf der Beobachtung, dass alle lebenden Gewebe dynamisch auf mechanische Einwirkungen reagieren und sich adaptieren. Während der Expansion bleiben die Funktion und Gewebseinheiten des darüber liegenden Hautlappens intakt. Die Wundheilung läuft physiologisch ab.

Grundsätzlich scheint die Flächengewinnung bei der Präexpansion von zwei Quellen gespeist zu werden. Zum einen wird die Haut von benachbarten Hautgebieten rekrutiert. Zum anderen deutet die tatsächliche Neubildung auf die expandierte Epidermisschicht hin [23].

Technisch wird der Expander bei der Präexpansion eines fasziokutanen Lappens unter der Faszie eingesetzt. Obwohl der Expander eine flächige signifikante Vergrößerung und eine dünnere Lappendicke in den ersten Wochen erzeugt, ist jedoch der expandierte Hautlappen extrem gut vaskularisiert und kann dadurch zuverlässiger transplantiert werden. Im Vergleich zum direkt gehobenen Lappen steigerte die Expansion das gesamte Gefäßnetz im Gewebe bis auf 117% [33].

Die klinischen Anwendungen dieses Verfahrens wurden in der Literatur publiziert [62, 67]. Als ein gutes Beispiel hierfür war die erfolgreiche Anwendung des im Hals hergestellten PIE-Lappens (Präfabrizierte Induzierte Expansion) von Germann G. und Mitarbeiter 1998 [67] zur Defektdeckung nach der Resektion von multiplen Basaliomen und Spinaliomen der Wange.

- Präfabrizierung durch Umformung der Gewebeart: Die Umformung eines Gewebes in die gewünschte Form stellt die dritte Möglichkeit dar. Mit Hilfe von den sogenannten "*Tissue Transforming Factors*" bestehend aus dem osteoinduktiven Faktor, Osteogenin und der demineralisierten Knochenmatrix, berichteten Khouri R.K. und Mitarbeiter im Jahr 1991 bei Ratten über eine experimentelle Transformation vom Muskelgewebe zu vaskularisiertem Knorpel- und Knochengewebe in geeigneten Formen [107]. Diese Methode befindet sich bis heute jedoch noch im experimentellen Stadium.

- Präfabrizierung durch neovaskularisierten Hautlappen:

Dieses Verfahren repräsentiert derzeit die interessanteste Möglichkeit. Die Lappenpräfabrikation erfolgt durch Implantation eines Gefäßstielträgers in die als zukünftiges Spendergebiet ausgewählte Hautregion, welches mittels der Neovaskularisation in einen axial gefäßgestielten Gewebelappen umgewandelt wird. Durch dieses Verfahren können neue transplantationsfähige Gewebelappen geschaffen werden, die am Körper anatomisch so vorher nicht existierten.

Grundsätzlich können verschiedene Gefäßstielträger angewendet werden:

Das Omentum majus mit einem ausgiebigen Gefäßnetz als Gefäßträger für die Lappenpräfabrikation wurde von verschiedenen Autoren klinisch und experimentell beschrieben [50, 52, 101, 198].

In der klinischen Routine publizierten McLean und Buncke (1972) erstmalig die klinische Verwendung vom Omentum majus mit darüber liegendem Hauttransplantat zur Deckung eines größeren Skalpdefekts [123]. Im Jahr 1981 berichtete Shen auch über die erfolgreiche Anwendung von präfabrizierten Lappen aus dem Omentum majus, um schwere Verbrennungsverletzungen im Kopf-, Brust- und Kniebereich zu rekonstruieren [165].

Die experimentelle Arbeitsgruppe von Erol und Spira (1978, 1980, 1981) führte bei Schweinen die Herstellung der präfabrizierten Gewebelappen aus dem Omentum majus, autologen Rippenknorpeln, Ohrknorpel und Beckenknochen als Gerüstmaterial sowie deckenden Hauttransplantaten mit anschließender freier Transplantation durch. Zhang (1994) verlagerte experimentell das Omentum majus unter die Bauchhaut und setzte die Fläche des Gefäßträgers in Relation zur Fläche des neovaskularisierten Hautlappens, um Rückschlüsse auf die maximale Ausdehnung der überlebenden Hautflächen zu ziehen. Er ermittelte eine etwa doppelt so große Hautfläche im Verhältnis zu dem darunter liegenden Durchblutungsträger [208].

Obwohl das Omentum majus ein ideales Bett für das Anwachsen von Haut-, Knorpel- und Knochenimplantaten darstellt, wird die Lappenpräfabrikation wegen des aufwendigen Operationsverfahrens klinisch selten verwendet. Einerseits erfordert dieses Verfahren die Bauchhöhle zu eröffnen, was gefährliche intraoperative Risiken und postoperative Komplikationen verursachen kann. Andererseits gibt es zur Zeit verschiedene Gefäßträgeralternativen mit minimaler Hebedefektmorbidität.

Die vaskularisierte Faszie als Gefäßträger zur Lappenpräfabrikation wurde von vielen Autoren beschrieben [67]. Das Prinzip dieses Verfahrens ist die Implantation eines axial gefäßgestielten Faszienlappens unter die Dermis, um so einen neuen fasziokutanen Hautlappen herzustellen. Als bestes klinisches Beispiel hierfür wurde die Präfabrikation eines temporalen Faszienlappens von Khouri (1991) vorgestellt. Der Autor und seine Mitarbeiter transplantierten bei einem 12 Jahre alten Kind einen gefäßgestielten temporalen Faszienlappen durch Anastomosierung an die Arteria und Vena dorsalis pedis am Fuß und legten diesen Lappen um das Zehengrundgelenk. Nach 6 Wochen wurde das präfabrizierte Transplantat aus dem gefäßgestielten Temporalis-Faszienlappen und neovaskularisiertem Zehengrundgelenk erfolgreich zur Hand transplantiert. Die Anastomosierung der Gefäße erfolgte an Arteria und Vena ulnaris. Das Verfahren erscheint eine zuverlässige Methode zur Lappenpräfabrikation zu sein, da eine Neovaskularisation im Lappen auf jeden Fall sicher erfolgt. Der Hauptnachteil dieser Methode besteht darin, dass die Präfabrikationstechnik sehr schwierig ist. Ferner ist der präfabrizierte Lappengefäßstiel abhängig vom Faszienlappengefäßstiel gewesen.

Der arterio-venöse Gefäßstiel stellt eine interessante und hervorragende Gefäßträgervariante zur Herstellung eines neovaskularisierten Hautlappens dar. Die Verwendung wurde in zahlreichen experimentellen und klinischen Studien bereits nachgewiesen.

Die experimentelle Hautlappenpräfabrikation wurde erstmalig von Schechter und Mitarbeiter im Jahre 1969 publiziert [161]. Am Modell des Hundes implantierten sie Gefäßträger aus Arteria und Vena femoralis mit unterschiedlichen Modellen in die Subkutis an der Oberschenkelregion und beschrieben potentielle Möglichkeiten für eine zukünftige Anwendung. Shen (1981) implantierte das mobilisierte arterio-venöse Gefäßbündel des Kaninchenohres in einen gerollten Hautlappen am Hinterhaupt und erzeugte so einen axial gefäßgestielten präfabrizierten Hautlappen [165]. Wenige Jahre später entwickelten Hirase und Mitarbeiter (1987-1989) mehrere experimentelle Modelle zur Konstruktion eines präfabrizierten Hautlappens aus einem Gefäßstiel in Kombination mit Haut-, Muskel-, Knochen- und Knorpelgewebe [83-86]. Zur Neovaskularisation der verschiedenen Gewebsarten benutzte er überwiegend Arteria und Vena epigastrica superficialis inferior der Ratte. Duffy und Mitarbeiter (1993) beschrieben die Neovaskularisation eines Hautareals des Kaninchens durch Implantation eines vom Außenohr entnommenen arterio-venösen Gefäßbündels [46]. Nach verschiedenen

Verweilzeiten konnte er dann die entstandenen gefäßgestielten Hautlappen erfolgreich zum Außenohr zurücktransplantieren. Am Modell der Ratte berichteten Tanaka und Mitarbeiter (2003), Neumeister und Mitarbeiter (2006) in jüngster Zeit über den erfolgreich neovaskularisierten Gewebslappen im Inguinalbereich in Verbindung mit Gewebsregenerierung durch die Implantation eines arterio-venösen Gefäßstieles aus Arteria und Vena femoralis.

Über die klinischen Anwendungen eines neovaskularisierten Hautlappens wurden von verschiedenen Autoren berichtet. Hyakusoku (1987) publizierte über einen erfolgreich präfabrizierten Haarinsellappen durch Implantation des ipsilateralen arterio-venösen temporalis superficialis Gefäßstieles im Haarbereich des Kopfes, um hiermit die Oberlippe zu rekonstruieren. Im Jahre 1992 beschrieben Itoh und Arai [100] die erfolgreiche Rekonstruktion eines Nasenflügels mit einem präfabrizierten freien Hautlappen. Sie präparierten die Arteria und Vena thoracodorsalis und verlegten diese unter die Haut der ipsilateralen Supraclavicularregion des Patienten. Zwei Wochen später wurde der kombinierte, präfabrizierte Lappen aus Haut und Gefäßstiel zur Rekonstruktion eines Nasenflügels im Gesicht transplantiert. Der Lappengefäßstiel wurde an A. V. facialis angeschlossen. Pribaz und Mitarbeiter (1994) berichteten in einer Veröffentlichung über eine Teilnekrose des präfabrizierten Hautlappens wegen unzureichender Neovaskularisation bei der Rekonstruktion eines kombinierten Stirn- und Nasenweichteildefektes unter lokaler Implantation der ipsilateralen A. V. thoracodorsalis am lateralen Oberarm [150]. Morrison und Mitarbeiter (1997) beschrieben die Transplantation dünner präfabrizierter Hautlappen durch arterio-venöse Gefäßstielimplantation mit Endligatur aus A.V. inferior epigastric, A.V. thoracodorsalis und A.V. temporalis superficialis zur Defektrekonstruktion im Knie- und Gesichtsbereich mit günstigen postoperativen Ergebnissen [129]. Die Arbeitsgruppe von Pribaz und Mitarbeiter (1999) berichtete auch über ihre Erfahrungen bei der klinischen Anwendung von neovaskularisierten Hautlappen zur Hautdefektdeckung im Hals- und Gesichtsbereich [151]. Von ihren 17 klinisch hergestellten neovaskularisierten Hautlappen wurden 15 Lappen in 12 Patienten (88,2%) erfolgreich transplantiert.

Diese klinischen Veröffentlichungen haben bewiesen, dass das Prinzip von präfabrizierten Hautlappen am Menschen möglich ist. Die klinischen Fallverluste zeigten jedoch das Fehlen eindeutiger experimenteller Untersuchungen zur Neovaskularisation in präfabrizierten Hautlappen nach Gefäßstielimplantation.

Um diese Technik in der klinischen Routine zuverlässig etablieren zu können, sollten weitere experimentelle Arbeiten hinsichtlich Standardisierung und Optimierung der Neovaskularisation in präfabrizierten Hautlappen mit unterschiedlichen Gefäßstielvarianten durchgeführt werden.

2.3. Tissue Engineering von Knorpelzellen

- Tissue Engineering: Geschichte und aktueller Stand

Das junge sich rasch entwickelnde Forschungsgebiet "Tissue Engineering" (TE) basiert auf einer interdisziplinären Zusammenarbeit der Bereiche Biomaterialentwicklung, Zellbiologie und Zellkulturtechnik zum Zwecke der Herstellung lebender, bioartifizieller Ersatzmaterialien für die funktionelle Wiederherstellung, Erhaltung und Verbesserung des menschlichen Gewebes.

Obwohl der Begriff "Tissue Engineering" erstmalig von Vacanti C.A. und Mitarbeiter 1991 im Artikel "*Functional Organ Replacement: The New Technology of Tissue Engineering*" in the "*Surgical Technology International*" vorgeschlagen wurde, war die Grundidee des Tissue Engineerings im wesentlichen seit langem bekannt [191]. Die erste experimentelle Untersuchung zu diesem Thema stammte aus den frühen 1970'ern von W.T. Green aus Amerika [191]. Am Nacktmausmodell generierte der Untersucher neues Knorpelgewebe unter Verwendung von aus einem kleinen Knochensporn stammenden Chondrozyten, welche er in vivo replantierte. Obwohl diese Experimente nicht erfolgreich waren, vermutete der Autor jedoch bereits, dass mit zukünftigen technologischen Fortschritten die Herstellung von neuen funktionellen artifiziellen Geweben durch die Zellregenerierung und Zellbesiedlung in geeigneten Biokonstrukten möglich sein wird.

Der Schlüsselpunkt in der Entstehung des Begriffes "Tissue Engineering" war bereits 1988, als J. Vacanti und Langer R. die erfolgreiche Herstellung eines aus synthetisch biokompatiblen und bioabbaubarem Polymer stammenden Biokonstrukts mit Zellen entwickelt hatten [191]. Durch dieses Vorgehen lässt sich die Möglichkeit realisieren, mit einer minimalen Menge autologer Zellen über die Zellvermehrung und Zellbesiedlung einen maximal großen Gewebekblock zu schaffen. Aufgrund des Verfahrens erscheint es möglich, verschiedene Gewebe bzw. Organsysteme durch eine labortechnische Amplifikation der entsprechenden Zellen ersetzen zu können. Diese aussichtsreichen Perspektiven, im Hinblick auf die potenzielle Ersatzmöglichkeit humaner lebender und funktioneller Organe, haben bis heute Forscher in vielen Zentren der Welt mit Hochdruck vorangetrieben.

Prinzipiell konnte die Gewebezüchtung von verschiedenen lebenden Organen wie Haut-, Fett-, Muskel-, Knochen-, Knorpel-, Nerven- und Gefäßzellen usw. durchgeführt werden.

Zwischenzeitliche Schwerpunkte an der Herstellung von "tissue-engineerten" Geweben, die von Forschungsgruppen im Labor untersucht werden, sind die Züchtung von Knorpel-, Knochen-, Fett- und Nervengewebe sowie Angiogenesen und verschiedenen humanen Organen wie Herzklappen oder artifizielle Dünndarmsegmenten [191].

Heute gibt es bereits kommerziell erhältliche Produkte der Gewebezüchtung, die auch gegenwärtig klinische Anwendungen in der Dermatologie finden, wie z. B. Dermagraft (Dermistransplantat) und Intergra® (artifizieller Dermisersatz, Kollagen-Glucosaminoglycan-Matrix) für die Verbrennungsbehandlung oder Apligraf® (allogene Epidermis auf fibroblastenbesiedelte Kollagenmatrix) für die Behandlung chronischer Wunden.

Die klinische Anwendung der gezüchteten Gewebe blieb hinter der anfänglichen Erwartung zurück. Vacanti und Mitarbeiter (1991) publizierten die erste klinische Verwendung von einem synthetischen Polymerkonstrukt mit gezüchteten Knorpelzellen zum Ersatz des Sternums bei einem jungen Patienten mit Poland-Syndroms, bei dem das Brustbein fehlgebildet war [191]. Im Jahr 2001 berichteten Shin'oka und Mitarbeiter [167] in Tokio über die klinische Verwendung einer gezüchteten Lungenarterie. Ronga und Mitarbeiter (2006) beschrieben die Meniskusrekonstruktion bei einem 40 Jahre alten Patienten unter Verwendung von auf einer Kollagenmembran implantierten autologen Chondrozyten mit guten postoperativen Ergebnissen [154]. Hollander und Mitarbeiter [86] berichteten im Jahr 2006 über die erfolgreiche klinische Anwendung von autologen gezüchteten Knorpelzellen für die Rekonstruktion verletzter osteoarthritischer Humaner Knie bei 23 Patienten. Diese Beispiele haben einerseits potenzielle Anwendungsmöglichkeiten des Tissue Engineering vom Knorpelgewebe bewiesen, und andererseits fordern weitere experimentelle Untersuchungen zur Verbesserung der Zellkulturtechnik und Konstruktherstellung für eine effektive klinische Anwendung in der Zukunft.

- Tissue Engineering von Knorpelgewebe

Tissue Engineering von Knorpelgewebe stellt zwischenzeitlich einen Schwerpunkt bei der Gewebezüchtung dar. Zur Schaffung eines gezüchteten Knorpelgewebes ist die stabile Verbindung zwischen in vitro gezüchteten Knorpelzellen und entsprechendem kompatiblen Zellträger von entscheidender Bedeutung. Zusätzlich können heute verschiedene biologische Faktoren wie Bioreaktor oder Wachstumsfaktoren angewendet

werden, um eine Verbesserung der Qualität von in vitro gezüchteten Knorpelzellen und eine Verkürzung der Kulturzeit zu erzielen [173].

Physiologie der Nativen Knorpelzellen

Das Knorpelgewebe kommt sowohl in Gelenken, im Rippenbogen als auch im Atemtrakt vor. Funktionell zeichnet es sich durch Druckelastizität und die Fähigkeit, Gewicht zu tragen, Stützformgewebe und das Gleiten zu ermöglichen aus. Histologisch besteht Knorpelgewebe aus Chondrozyten, extrazellulärer Matrix und dem Perichondrium.

Die Chondrozyten sind in isogenen Gruppen von bis zu zehn Zellen angeordnet und von einer Chondroitinsulfatkapsel sowie einem Zellhof aus kollagenen Fasern umgeben. Die jungen Chondrozyten sind flach, die reifen sind rund und die älteren sind oft hypertrophiert. Lichtmikroskopisch werden diese Komplexe als Chondrone bezeichnet. Diese Chondrone geben dem Knorpelgewebe seine wesentliche Druckelastizität [125].

Die extrazelluläre Matrix ist als Kittsubstanz für die Stabilität und Elastizität des Knorpels verantwortlich. Nach unterschiedlicher extrazellulärer Matrix wird das druckfeste Stützgewebe in einen hyalinen (wie z. B. Rippen-, Gelenk-, Tracheal- und Nasenknorpel), elastischen (wie z. B. Ohrmuschel, Larynx) und Faserknorpel (wie z. B. Symphysis pubica, Discus intervertebralis) unterteilt [125].

Üblicherweise setzt sich die extrazelluläre Matrix aus Kollagen, Wasser und verschiedene Proteoglykanen zusammen. Das Kollagen mit überwiegendem Kollagen Typ-II macht einen großen Teil des Trockengewichts des Knorpels aus. Die Proteoglykane als ein Produkt der Chondrozyten bestehen aus einer Proteinstruktur und Heteroglykanketten, die als Glykosaminoglykane (GAGs) bezeichnet werden. Beim GAGs dominieren Hyaluronsäure, Chondroitin-4-Sulfat und Keratansulfat, wobei Chondroitin-4-Sulfat bis zu 40% des Trockengewichtes von Knorpelgewebe ausmacht [125].

Das Perichondrium ist ein dichtes Bindegewebe und besteht aus Fibrozyten und Bindegewebsfasern. Es dient dem Wachstum und dem Erhalt des avaskulären Knorpelgewebes mit Ausnahme des Gelenkknorpels. Aus diesem Grund kann der Gelenkknorpel nicht regeneriert werden [176].

Die Regenerationsfähigkeit des Knorpels ist insgesamt eingeschränkt. Bei einer Knorpelläsion nach Wachstumsabschluss wird diese Stelle mit perichondrialen

Bindegewebszellen aufgefüllt. Diese können sich jedoch nur zu einem kleinen Teil metaplastisch zu Knorpelzellen umwandeln [125, 173].

Das Knorpelgewebe ist regelhaft nicht vaskularisiert. Die Ernährung des Knorpels, als ein bradytrophes Gewebe, erfolgt durch Diffusion über die extrazelluläre Matrix. Nährstoffe gelangen über das gefäßreiche Perichondrium zum Knorpelgewebe [157].

In vitro gezüchtete Knorpelzellen

Zur Züchtung von Knorpelgewebe können verschiedene Zellquellen verwendet werden. Seit längerem bekannt ist die Nutzung von Chondrozyten [2, 23, 158, 175, 23] oder Perichondrium [142, 148, 187]. Ein aktueller Ansatz ist die Verwendung von mesenchymalen Stammzellen und embryonischen Vorläuferzellen [131, 171, 191]. Im Hinblick auf die klinische Anwendung scheint jedoch das Tissue Engineering von autologem Knorpel mit differenzierten Chondrozyten eine sehr vielversprechende und praktische Methode zu sein.

Zur Züchtung unter Verwendung von differenzierten Chondrozyten werden die Zellen durch eine kleine Gewebebiopsie (z. B. aus Gelenk, Rippe, Nasenseptum, Ohrmuschel) gewonnen. Diese Zellen werden enzymatisch aus ihrem Zellverband isoliert und anschließend in der Monolayerkultur amplifiziert. In der Regel lassen sich aus 100.000 isolierten Zellen nach 3 – 4 Passagen bis zu 40 Millionen Zellen züchten [2, 125, 173].

Bei der Amplifikation werden die Zellen üblicherweise dedifferenziert, wobei die Chondrozyten einerseits ihre Morphologie von runden, in spindelige Zellen verändern und andererseits ihr Expressionsmuster von knorpelspezifischem Kollagen Typ II, zu bindegewebstypischem Kollagen Typ I umstellen [13, 119, 176, 197].

Wenn diese dedifferenzierten gezüchteten Zellen wieder in einen dreidimensionalen Zellträger eingebracht werden oder durch den Zusatz von Wachstumsfaktoren wie TGF-beta usw. [24, 125] kommt es zu einer Redifferenzierung und Reexpression von knorpelspezifischen Proteinen entsprechend dem nativen Knorpel. Im Hinblick auf die Ausrichtung der extrazellulären Matrix und die daraus erwachsende Binnenarchitektur sind die gezüchteten Knorpelzellen jedoch weniger differenziert [3, 13, 29, 35].

Biomaterial-Zell-Konstrukte

Zur Zellbesiedlung gibt es verschiedene Trägermaterialien, die durch ihre Eigenschaften für die Zelltransplantation geeignet sind. Grundvoraussetzungen betreffen hierbei die

Biokompatibilität, Biodegradierbarkeit, Konsistenz, strukturelle Eigenschaften und Sterilisierbarkeit [2, 24, 170, 176].

Obwohl die Frage nach dem idealen Biomaterial im Bereich der Knorpelzüchtung noch nicht abschließend geklärt ist, können praktisch verschiedene aus biologischen und synthetischen Substanzen stammende Zellträger im Rahmen des Tissue Engineering verwendet werden. Auch die Kombination beider Biomaterialien wurde in der Literatur beschrieben [173].

Die biologischen Materialien haben Vorteile, da sie eine homogene dreidimensionale Verteilung der Chondrozyten ermöglichen und somit die Redifferenzierung der Zellen begünstigen. Limitationen bei der Verwendung sind häufig eine mangelnde mechanische Stabilität und deutliche Schrumpfungstendenzen.

Der Vorteil der synthetischen Materialien ist ihre Formstabilität. Limitierend ist jedoch, dass der schnelle Abbau in vivo zu einem saurem Milieu führt, was für die Zellen zytotoxisch ist. Aufgrund dieser dargestellten Limitationen muss es noch weiter versucht werden, geeignete synthetische Biomaterialien herzustellen [156, 173].

Einige Charakteristika von biologischen und synthetischen Materialien:

Biologische Substanzen

- *Hyaluronsäurederivat*: hochmolekulares Mukopolysaccharid, natürlicher Bestandteil der Knorpelmatrix, gute Gewebeerträglichkeit, erhöhte hydrolytische Stabilität durch synthetische Veresterung, als Folie, Vlies oder Gel verfügbar.
- *Kollagen*: meist dermales Kollagen I und III, verschiedener Spezies, z. B. equin, als nicht gewebtes Vlies oder Gel verfügbar.
- *Fibrin, Gelsystem*: Verfestigung bei Raumtemperatur, Schrumpfung der Struktur beginnt bereits nach 3 Tagen bis Wochen.

Synthetische Substanzen

- *Polycaprolacton*: Schmelzpunkt 58° - 63°C, hydrophob, Hydrolyse über instabile aliphatische Esterbindungen, Degradationszeit ca. 2 Jahre. Gute Formschäumung und Eignung für das 3D-Printing.

- *Polyglycolsäure (PGA)*: Schmelzpunkt 185°-225 °C, gute thermische Stabilität, löslich in organischen Lösungsmitteln, Verlust der mechanischen Stabilität (50%) innerhalb von 2 Wochen, komplette Resorption innerhalb von 4 - 6 Monaten.
- *Polylactonsäure (PLA)*: Schmelzpunkt 170° - 180 °C, hydrolytischer Abbau innerhalb von 2 - 12 Monaten, jedoch stark von der Geometrie und Besiedlung abhängig.

Additive Faktoren

Der Ansatz von unterschiedlich biologischen mechanischen Faktoren wie Wachstumsfaktor oder Bioreaktoren scheint eine viel versprechende Methode zu sein, um die Morphologie der gezüchteten Konstrukte zu verbessern.

Wachstumsfaktoren

Zur Verkürzung der Kultur- und Besiedlungszeit oder zur Erzeugung einer in vitro Redifferenzierung der gezüchteten Zellen können entsprechende Wachstumsfaktoren angewendet werden. Beim Tissue Engineering sind verschiedene Wachstumsfaktoren bekannt, welche regulatorisch auf die Verbesserung der Qualität von Chondrozyten einwirken. Insulin-like-Growth-Factor (IGF) steigert z. B. die Synthese von extrazellulärer Matrix (ECM) und stimuliert die Proliferationsrate [125, 158]. Fibroblast-Growth-Factor (FGF) ist ein Proliferationsfaktor und verbessert die Chondrozytendifferenzierung aus mesenchymalen Stammzellen [119, 141, 173]. Der Transforming-Growth-Factor- β (TGF- β) wirkt auf die Proliferation, Differenzierung und Syntheseleistung [125, 196]. Um Effekte von Wachstumsfaktoren zu nutzen, werden Wirksubstanzen wie z. B. IGF-I während der Koagulation im Fibringel eingebettet und somit einen längeren Zeitraum vom Konstrukt freigesetzt. Die Freisetzung von Wirksubstanzen kann über einen Zeitraum von Tagen bis Monaten kontrolliert werden.

Bioreaktoren

Im Tissue Engineering vom Knorpelgewebe zeigen sich während der Kultivierung in vitro Abschnitte ohne Matrixsynthese [24, 29, 119, 173]. Um die Qualität des in vitro gezüchteten Knorpels zu steigern und eine bessere Ausgangsposition für die nachfolgenden in vivo Verhältnisse zu schaffen, sollte die Verteilung der Zellen innerhalb der Konstrukte optimiert werden.

Rotierende Bioreaktoren mit verschiedenen kommerziellen Modellen führen zur Verbesserung der Verteilungsqualität der von in vitro gezüchteten Knorpelzellen in Biokonstrukten, wie von vielen Autoren bestätigt werden [19, 201].

3. ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG

Zielsetzung

- Die klinischen Anwendungen von präfabrizierten Hautlappen haben gezeigt, dass es nach wie vor an klaren Untersuchungen fehlt, die hinsichtlich der Standardisierung der Neovaskularisation im Hautlappen, wie der Beeinflussung durch den Blutfluss im Gefäßstiel, die Zeitdauer bis zur ausreichenden Neovaskularisation nach Gefäßstielimplantation und Ausmaß des dann gut vaskularisierten Areals Ergebnisse liefern.

Das erste Ziel dieser Arbeit ist es, die Neovaskularisation in präfabrizierten Hautlappen mittels Gefäßstielimplantation bzw. freier neovaskularisierter Lappentransplantation experimentell zu standardisieren, um diese Technik in die klinische Routine zuverlässig einsetzen zu können.

Zweitens sollte die Neovaskularisation durch die Verwendung von unterschiedlichen implantierten Gefäßstielvarianten wie arterio-venösem Gefäßstiel mit minimalem Blutfluss durch endständige Ligatur, arterio-venösem Gefäßstiel mit maximalem Blutfluss durch endständige Anastomose, isolierter arterialisierter venöser Gefäßschlinge, isolierter arterieller Gefäßschlinge und arterio-venösem Gefäßstiel in Kombination mit Gewebe-Expandern direkt verglichen werden, um eine Optimierung oder Beschleunigung der Neovaskularisation zu erzeugen.

- Mit Hilfe des Tissue Engineering eröffnet sich die Möglichkeit, vitales Gewebe mit dreidimensionalen Strukturen entsprechend den klinischen Anforderungen möglichst originalgetreu bereitzustellen. Obwohl vorhergehende Arbeiten des Tissue Engineerings vielversprechende Perspektiven zeigen, ist es bisher nicht als eine etablierte Behandlungsmethodik in die klinische Routine eingeflossen.

Zusätzlich stellt beim Tissue Engineering die Neovaskularisierung von gezüchtetem Gewebe bzw. die Herstellung von artifiziellen Gewebelöcken mit axialem Gefäßstiel zur mikrochirurgischen freien Transplantation ein zentrales kritisches Problem dar. Die Frage, wie man große gezüchtete Gewebelumina mit eigener Gefäßversorgung - unabhängig von den anatomischen Gefäßstielen und Transplantationsstrecken - versorgt, ist eine bis heute noch ungelöste Problematik.

Das darauf basierende Ziel bestand darin, im Tiermodell diese offenen Fragen des Tissue Engineerings hinsichtlich der Neovaskularisierung und der Fähigkeit der freien mikrochirurgischen Transplantation bestehender Verbundhautlappen aus Lappenpräfabrikation und gezüchteten Knorpelzell-Biomaterialkonstrukten zu erarbeiten, um so die Technik in naher Zukunft des klinischen Alltages zu etablieren.

Fragestellung

- I. Die Abhängigkeit der Neovaskularisation präfabrizierter Gewebelappen von der Implantation nachfolgend aufgeführter Varianten des Gefäßstiels zu untersuchen:
 1. Arterio-venöse Gefäßstiele mit endständiger Ligatur (Modell 1)
 2. Arterio-venöse Gefäßstiele mit endständiger Anastomose (Modell 2).
 3. Isolierte arterialisierete venöse Gefäßschlinge (Modell 3)
 4. Isolierte arterielle Gefäßschlinge (Modell 4)
 5. Arterio-venöse Gefäßstiele in Kombination mit Gewebe-Expandern (Modell 5).

- II. Die Verwendungsmöglichkeit von implantierten Gefäßstielen zur Herstellung präfabrizierter Gewebelappen tierexperimentell zu standardisieren und zu optimieren.

- III. Die Neovaskularisation, Formbeständigkeit, Gewebsintegration sowie -vitalität von in einen präfabrizierten neovaskularisierten Bauchhautlappen implantierten gezüchteten Knorpelkonstrukten zu testen, um die Verwendungsmöglichkeit der kombinierten Zellzüchtung-Lappenpräfabrikation zu erweitern.

- IV. Auf dem Boden der unter I – III gewonnenen Erkenntnisse neue chirurgische Strategien zu entwickeln, welche die klinische Anwendung präfabrizierter Gewebelappen in Kombination mit dreidimensionalen durch Tissue Engineering hergestellten Zellen-Biomaterialkonstrukten ermöglichen.

4. MATERIAL UND METHODE

4.1. STUDIE I: Neovaskularisation in präfabrizierten Hautlappen

4.1.1. Versuchstier

In der Versuchsreihe wurden weibliche Chinchilla-Bastard Kaninchen, im Alter von 9 - 12 Monaten mit Körpergewichten zwischen 3000 bis 4500 Gramm verwendet. Die Tiere stammten aus einer Versuchstierzucht (Charles River GmbH, Sulzfeld, Deutschland) und wurden etwa eine Woche vor dem OP-Termin angeliefert. Sie wurden in Einzelkäfigen auf Lochblech gehalten und aus hygienischen Gründen dreimal wöchentlich umgesetzt. Die Lufttemperatur betrug 20° bis 23° Celsius bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% bis 70%.

4.1.2. Operationsvorbereitung und Anästhesie

Einen Tag vor dem Operationstermin wurde eine Allgemeinuntersuchung der Tiere insbesondere auf das Allgemeinverhalten, den Ernährungszustand sowie die Atmung sorgfältig durchgeführt, um Komplikationen bei der Narkose zu vermeiden.

Am Operationstag wurde dem Tier zuerst eine Narkose-Einleitung aus Ketamin (Ketatnest®, 40 mg/kg, Chassot, Lyssach, Schweiz) und Xylazin (Rompun®, 4 mg/kg, Vetoquinol AG, Bern, Schweiz) intramuskulär (i.m.) appliziert. Anschließend wurde die Bauchhaut des rechten und linken Abdomens sowie die beidseitigen Oberschenkelinnenseiten sorgfältig geschoren und mit einem Antiseptikum gereinigt. Nach der trachealen Intubation wurde das Tier auf dem Rücken mit lockerer Fixierung der Vorder- und Hinterläufe in Spreizstellung gelagert.

Um einem Auskühlen während der bis zu sechsständigen Operation entgegenzuwirken, wurde eine Heizmatte mit einer Temperatur von ca. 40° Celsius unter den Rücken gelegt. Zum Schutz des Auges wurde Augensalbe (Bepanthen®-Nasen- und Augensalbe, Hoffmann LaRoche Grenzach, Schweiz) auf Cornea und Konjunktiven aufgetragen. Zusätzlich wurde den Tieren Sauerstoff mit einem Fluss von zwei Litern pro Minute verabreicht. Durch Einbringen einer Verweilkanüle (Venflon®2, Ohmeda, Helsingborg, Schweden, Durchmesser 0,8/25 mm) in die Ohrvene erfolgte dann die intravenöse Weiterführung der Anästhesie, wobei 2 ml aus Ketamin und Xylazin des

oben genannten Mischungsverhältnisses in 8 ml NaCl-Lösung 0,9% (DAB 7 Braun, Deutschland; 1 ml für ca. 15 min.) appliziert wurde.

Die Vorbereitungen schlossen mit sorgfältiger Desinfektion und steriler Abdeckung des OP-Feldes in üblicher Weise ab. Alle Operationen erfolgten unter sterilen Kautelen.

4.1.3. Operationstechnik

Am rechten Abdomen des entsprechenden Versuchstieres wurde ein lateral gestielter Bauchhautlappen inklusive Panniculus Carnosus der Größe 8 x 15 cm geplant und gehoben (*Abb. 13 - 17*). Zur Vermeidung einer Gefäßeinsprossung aus dem Wundgrund wurde eine Silikonfolie (LPI[®], Firma Laboratoire Perouse Implant, Borneil, Frankreich) mit Dimension von 8 cm x 15 cm x 0,25 mm entsprechend der Abmessung des Lappens auf der Bauchwandfaszie mit monofilen Fäden der Stärke 3/0 (Nylon 3/0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) in fortlaufender Nahttechnik fixiert.

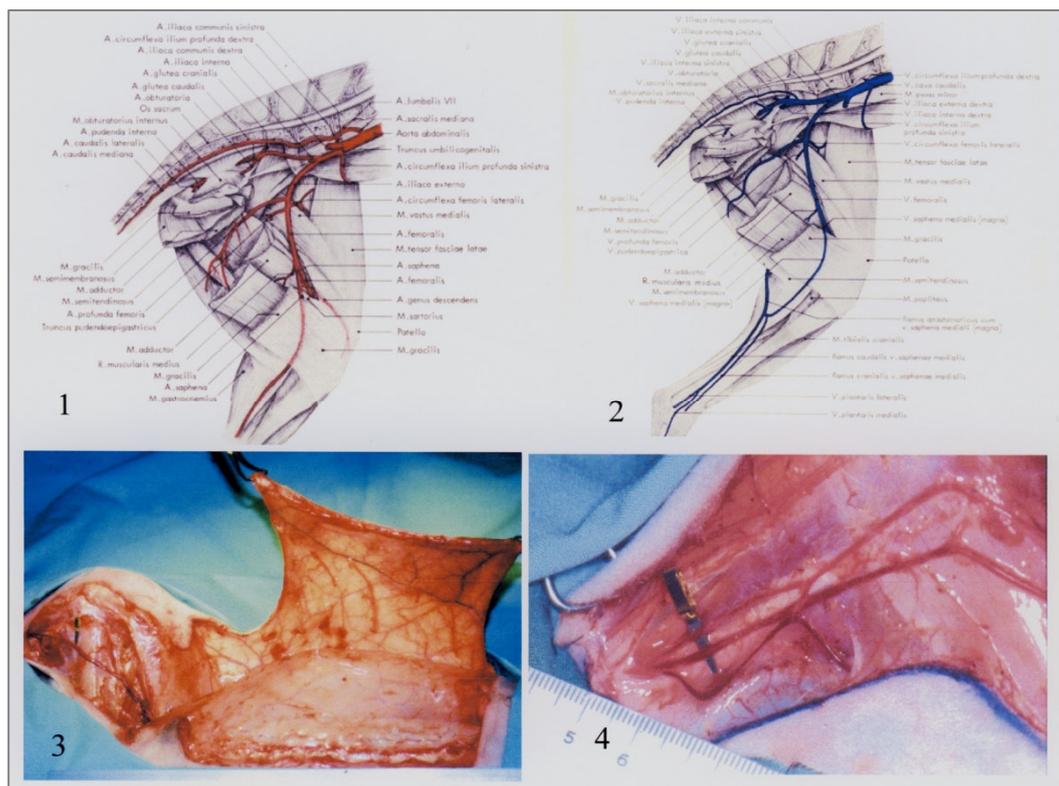


Abb. 13. Anatomische Darstellung der A. V. femoralis und saphena magna (1, 2) und Präparation des Bauchhautlappens mit Silikonfolie (3) und Gefäßsystem (4) beim Kaninchen.

Anschließend erfolgte die Präparation der Arteria und Vena femoralis. Dazu wurde von der zuvor angelegten queren Leisteninzision eine weitere Hautinzision nach kaudal entlang der medianen Achse der Oberschenkelseite bis zur Bifurkation der Arteria und Vena saphena magna gelegt. Anschließend wurden Arteria und Vena femoralis einschließlich der A. und V. poplitea und der A. und V. saphena magna sorgfältig präpariert. Wichtig hierbei war die Belassung einer dünnen Schicht des periadventitiellen Gewebes zum Schutz der Vasa Vasorum des Gefäßbündels. Dies geschah zur Erhaltung eines minimalen Restblutflusses und im Hinblick auf die spätere Neovaskularisation aus dem implantierten Gefäßstiel. Die Seitenäste des Gefäßstieles wie A. und V. profunda, A. und V. epigastrica superficialis inferior usw. wurden ligiert oder koaguliert und durchtrennt. Eine ischämiebedingte Komplikation der unteren Extremität war nicht zu erwarten und eine ausreichende Durchblutung des Beines blieb durch kollaterale Gefäßanschlüsse gesichert. Nach der Abpräparation entstand ein Gefäßstiel von ca. 12 cm Länge vom Leistenband bis zur Bifurkation der A. und V. saphena magna (*Abb. 13*).

Im nächsten Schritt erfolgte die Gestaltung verschiedener Modellvarianten des aus der Arteria und Vena saphena magna stammenden Gefäßstieles:

4.1.3.1. Modell 1: Endständige Ligatur des arterio-venösen Gefäßstieles (minimaler A.V. Blutfluss).

Das Gefäßstielende der Arteria und Vena saphena wurde endständig mit monofilem Nylon der Stärke 8/0 (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) unterbunden, durchtrennt und einfach unter dem Bauchhautlappen fixiert (*Abb. 14*).

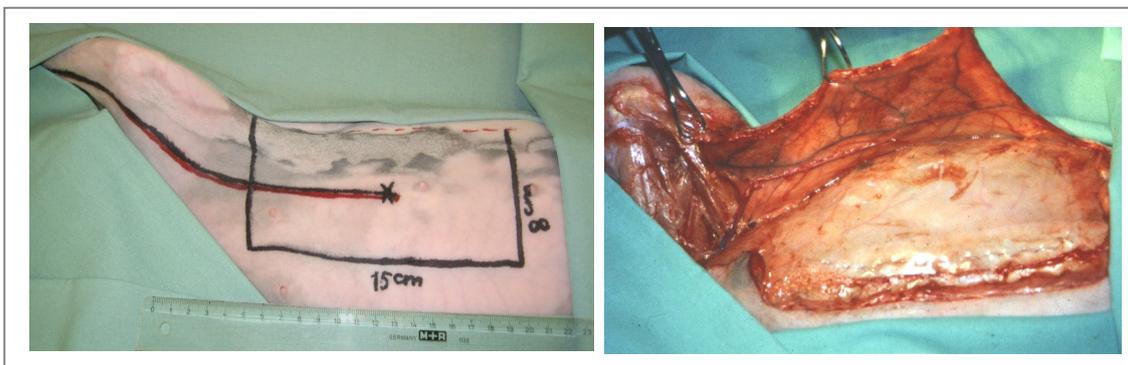


Abb.14. Schematische Darstellung des Modells 1 (Ligatur): Das Gefäßstielende wurde einfach ligiert und unter dem Bauchhautlappen fixiert.

4.1.3.2. Modell 2: Endständige mikrovaskuläre arterio-venöse Anastomose des Gefäßstieles (maximaler A.V. Blutfluss)

Unter Verwendung des Operationsmikroskopes JHK 1403 (ZEISS, Deutschland) mit 4 - 12-maliger Vergrößerung wurde das distale Gefäßstielende der Arteria und Vena saphena magna auf 1,5 cm Länge präpariert und voneinander separiert.

Die mikrochirurgische Anastomosierung zwischen Arterie und Vene (Durchmesser etwa 0,6 - 0,8 mm) erfolgte unter Verwendung einer Gefäßdoppelklemme nach Biemer in End-zu-End Einzelknopftechnik mit monofilem Nylon der Stärke 10/0 (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) unter Verwendung des Operationsmikroskopes JHK 1403 mit 15-facher Vergrößerung. Nach Öffnen der Doppelklemme wurde die Anastomose sorgfältig auf Dichtigkeit und Durchgängigkeit geprüft (*Abb. 15*).

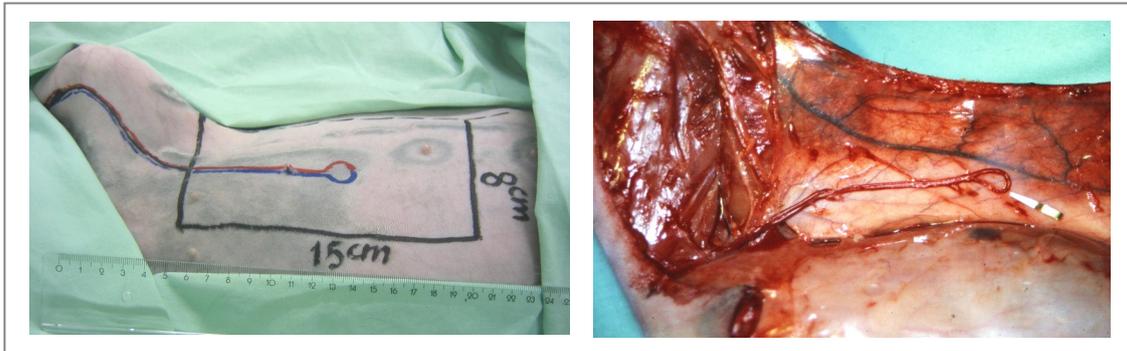


Abb.15. Schematische Darstellung des Modells 2 (Anastomose): Arteria und Vena saphena magna des distalen Gefäßstielendes wurden end-zu-end anastomosiert und unter dem Bauchhautlappen fixiert.

4.1.3.3. Modell 3: Isolierte arterialisierte venöse Gefäßschlinge

Zunächst wurden Arterie und Vene des Gefäßstiels auf der ganzen Länge voneinander separiert. Anschließend wurde der arterielle Anteil des Gefäßstiels entfernt. Der verbleibende venöse Stumpf wurde unter Vermeidung der Torsion nach oben umgeschlagen und mit der A. femoralis am Leistenband End-zu-End Einzelknopftechnik mit monofilem Nylon der Stärke 10/0 (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) mikrochirurgisch anastomosiert, um eine isolierte arterialisierte venöse Gefäßschlinge herzustellen (*Abb. 16*).

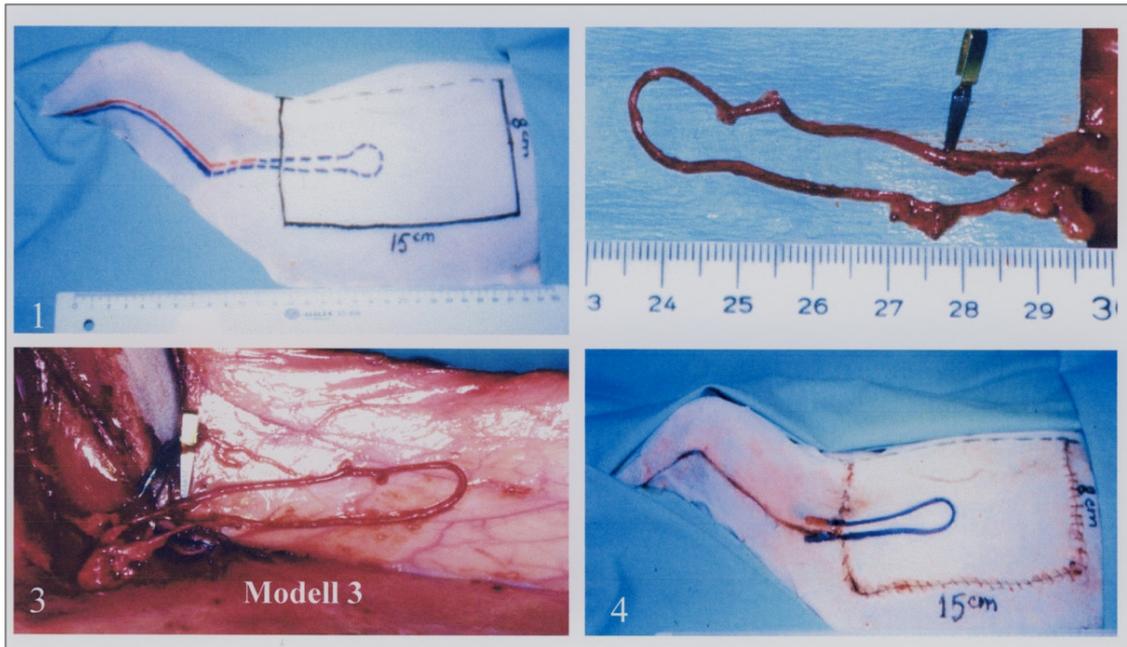


Abb. 16. Schematische Darstellung des Modells 3 (venöse Schlinge): (1) Lappendesign; (2) Herstellung einer isolierten arterialisierten venösen Gefäßschlinge; (3) Gefäßschlinge wurde unter dem Bauchhautlappen fixiert; (4) Verschluss aller Hautinzisionen.

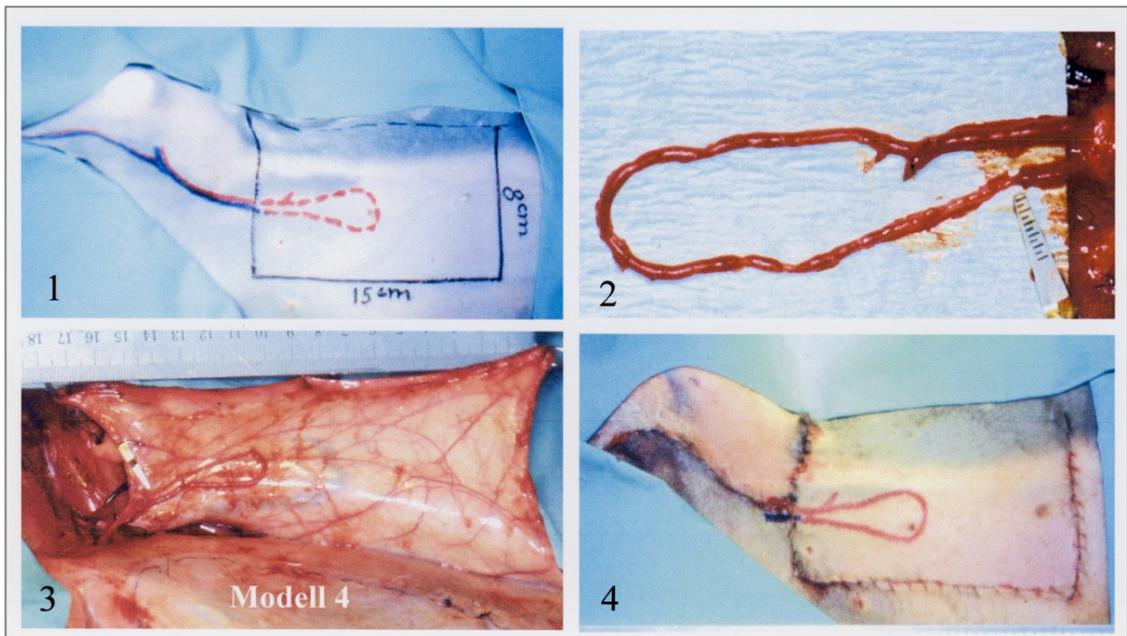


Abb. 17. Schematische Darstellung des Modells 4 (arterielle Schlinge): (1) Lappendesign; (2) Herstellung einer isolierten arteriellen Gefäßschlinge; (3) Gefäßschlinge wurde unter dem Bauchhautlappen fixiert; (4) Verschluss aller Hautinzisionen.

4.1.3.4. Modell 4: Isolierte arterielle Gefäßschlinge

Zunächst wurden Arterie und Vene des Gefäßstiels wie beim Modell 3 auf der ganzen Länge voneinander separiert. Hierbei wurde aber der venöse Anteil des Gefäßstieles entfernt. Der verbleibende arterielle Stumpf wurde unter Vermeidung der Torsion nach oben umgeschlagen und mit der V. femoralis am Leistenband End-zu-End mit monofilem Nylon der Stärke 10/0 (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) mikrochirurgisch anastomosiert. Hierdurch entsteht eine isolierte arterielle Gefäßschlinge (Abb. 17).

4.1.3.5. Modell 5: Arterio-venöse Gefäßstiele mit Gewebe-Expandern

Das operative Verfahren bei diesem Modell wurde gleich wie beim Modell 2 gestaltet, jedoch anstatt der Silikonfolie wurde ein 8 x 14 cm großer Gewebeexpander mit einem maximalen Füllungsvolumen von 250 ml (Radovan® Tissue Expander, MENTOR H/S, Irving, Texas, USA) auf der Bauchwandfaszie eingesetzt und mit Einzelknopfnähten an der Bodenplatte und am Füllungsport fixiert. Es bestand intraoperativ eine Vorfüllung mit 40 ml steriler NaCl-Lösung (DAB 7 Braun, Deutschland) (Abb. 18).

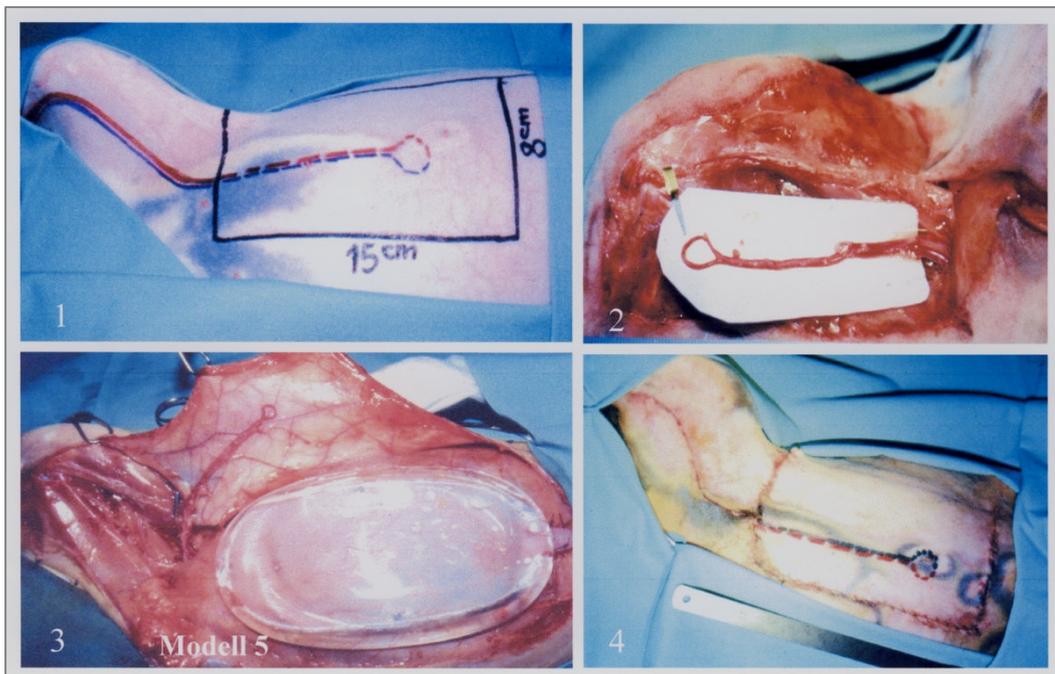


Abb. 18. Schematische Darstellung des Modells 5 (Expander) beim Kaninchen: Im Modell 5 wurde der arterio-venöse Gefäßstiel mit maximalem Blutfluss in Kombination mit einem 8 x 14 cm großer Gewebeexpander (Füllungsvolumen von 250 ml) gestaltet.

Anschließend wurde der neue Gefäßstiel unabhängig vom Gefäßstielmodell bei allen Tieren abknickungs- und rotationsfrei nach kranial umgeschlagen und unter dem Bauchhautlappen entlang der Mittellinie mit Vicryl 8/0 (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) fixiert.

In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass es bei direktem Kontakt der von Adventitia freipräparierten Gefäßanastomose mit dem Silikon zu einer erhöhten Thromboserate kam. Zum Schutz und zur Vermeidung von Thrombosen wurde deshalb die Anastomose bei allen mikrochirurgischen Anastomosen mit einem kleinen Stück der Muskulatur und einem Stück der Faszie (2 x 2 cm), entnommen aus dem ipsilateralen Oberschenkel, umhüllt.

Die Operation wurde mit dem schichtweisen Verschluss aller Hautinzisionen (Vicryl 4/0 und Nylon 3/0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) beendet. Abschließend erfolgte die Anlage eines dauerelastischen Sprühverbandes und eines Schlauchverbandes (Lohmann® tg- grip, 12 cm, Lohmann-25 Therapie-Systeme, Andernach, Deutschland).

Intraoperativ wurde bei allen Versuchstieren 1000 I.E. Heparin i.v (Heparin-Natrium 25000-ratiopharm, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) zur Thromboseprophylaxe des Gefäßstieles verabreicht. Zur Prophylaxe von Gefäßspasmen wurde Xylocain (Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) 0,05% 2 ml lokal verwendet. Zusätzlich wurde 1,0 ml Enrofloxacin 2,5% (Baytril® 5 mg/kg, Provet, Lyssach, Schweiz) zur Infektionsprophylaxe perioperativ (i.m.) injiziert. Zur Stabilisierung der Kreislauffunktion wurde den Tieren im Verlauf der Operation ca. 100 - 120 ml Ringerlactat (DAB 7 Braun) und 40 - 60 ml Rheomacrodex 10% (Rheomacrodex®, Pharmalink, Schweden) i.v. infundiert.

4.1.3.6. Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe erfolgten alle Hautschnitte genauso wie in der Untersuchungsgruppe, es wurden jedoch hierbei keine Gefäßstiele in Bauchhautlappen implantiert. Die Kontrollgruppe diente zur Bestimmung der physiologisch vorhandenen Gefäßmuster und Morphologie im Bauchhautlappen.

4.1.4. Postoperative Therapie und Beobachtungszeiträume

- Postoperativ wurden bei allen Versuchstieren ein Analgetikum (Buprenorphin 0,05 mg/kg KGW, Temgesic®, Essex, München, Deutschland) und ein Antibiotikum (Baytril®

5 mg/kg, Provet, Lyssach, Schweiz) subkutan für 3 Tage injiziert. Als Thromboseprophylaxe wurde allen Tieren 2-mal täglich 500 I.E Heparin s.c. (Ratiopharm, Ulm, Deutschland) für 7 Tage verabreicht. Futter und Wasser wurden ad libidum gegeben. Bei Wasseraufnahme unter 120 ml/Tag in den ersten drei postoperativen Tagen wurde die notwendige Restmenge subkutan infundiert.

Beim Modell 5 (Präfabrizierte Lappen in Kombination mit Gewebeexpander) wurde der Expander ab dem fünften Tag p. o. mit täglichen 20 ml-Injektionen von steriler Kochsalzlösung (Ringer- Laktat- Lösung, Delta- Pharma, Pfullingen, Deutschland) bis zum maximalen Volumen von 250 ml angeführt. Die postoperative Behandlung erfolgte in gleicher Weise wie bei den anderen Gruppen.

- Die Beobachtungszeiträume der Gefäßstielimplantation wurde bei allen Modellen in 4, 8, 12, 16 und 20 Tage gestaffelt. Nach Ablauf der entsprechenden Verweilzeit wurden die Untersuchungen über die Ausdehnung und Dichte der Neovaskularisation im präformierten Bauchhautlappen durchgeführt (s.u.). Am Ende wurden die Versuchstiere mit einer Überdosis Narcoren (160mg/Kg i.v., Merial, Hallbergmoos, Deutschland) getötet.

4.1.5. Untersuchungsparameter

Nach gestaffelten Zeiträumen von 4, 8, 12, 16 und 20 Tagen wurden die Versuchstiere hinsichtlich folgender Parameter untersucht:

4.1.5.1. Makroskopische Beurteilung und gestielte Lappentransplantation

Die makroskopische Kontrolle erfolgte hinsichtlich der Vitalität des Lappens, lokaler Infektionszeichen sowie sonstiger Veränderungen am Lappen und Gefäßstiel wie z. B. Schwellung, Serome oder Nekrosezeichen.

Nach 20 Tagen wurden die präfabrizierten Bauchhautlappen in gleicher Dimension (8 x 15 cm) unter Erhalt des neu implantierten Gefäßstiels umschnitten, als Insellappen gehoben und dann in situ zurückgenäht. Die Vitalität dieser gehobenen Lappen wurde täglich unter Beachtung von Farbe, Aussehen, Haarwachstum, Vitalität und Wundheilung über einen Zeitraum von 2 Wochen beobachtet.

4.1.5.2. Blutbilduntersuchungen

Zur Bestimmung der Veränderungen der Blutbilder vor und nach Gefäßstielimplantation wurden die Blutparameter gemessen. Dazu wurde ca. 1 ml arterielles Vollblut aus der Ohrarterie entnommen. Folgende Parameter wurden untersucht:

- *Klinisch - chemische Parameter.* (1306 pH/Blood Gas Analysen Gerät):

- pH (arterieller pH - Wert)	Normalwerte:	7,21 - 7,57	log
- PaO ₂ (arterieller p O ₂)		70,4 - 79,6	mmHg
- PaCO ₂ (arterieller p CO ₂)		33,4 - 43,3	mmHg
- HCO ₃ (aktuelles Bicarbonat)		16,8 - 26,9	mmol/l

- *Hämatologische Parameter.* (BAKER SYSTEM 9000 Gerät):

- WBC (White blood cells): Leukozyten.	Normalwerte :	9 - 11	Tsd/mm
- RBC (Red blood cells): Erythrozyten		4 - 7	mio./mm
- HGB (Hämoglobin)		10 - 15,5	g/dl
- HCT (Hämatokrit)		36 - 48 %	
- MCV (Mean cell volume)		59 - 75	cu microns
- MCH (Mean corpuskular hemoglobin)		19,5 - 24,7	pico g
- MCHC (Mean corpuskular hemoglobin concentration)		31,1 - 34,8	g/dl
- Lymph: (Lymphozyten)		30 - 80 %	
- GRAN: Granulozyten		20 - 75 %	

4.1.5.3. Szintigraphische Untersuchungen

Durch die chemische Ähnlichkeit (ähnliche Ionenradien; identische Ladung) des Thallium-Ions (Gruppe IIIA Metall) zum Kalium-Ion lässt sich vor allem die intrazelluläre Aufnahme über die Na-K-Pumpe der Zellmembran darstellen. Diese intrazelluläre Aufnahme gilt als Maß für die Vitalität von Zellen und wird zusätzlich von der initiativen Anflutung, d. h. von der lokalen Verfügbarkeit des Radiopharmakons bestimmt. Thl-201 Chlorid wird aus diesen Gründen in der nuklearmedizinischen Diagnostik zur myokardialen Perfusionsszintigraphie und zur Vitalitätsbestimmung von präfabrizierten Hautlappen benutzt. Der Vorteil der Szintigraphie gegenüber radiologischen Verfahren besteht vor allem in der relativ einfachen Quantifizierung der Ergebnisse über eine Bestimmung der Impulszahl.

Die Thallium-201 Chlorid Szintigraphie erfolgte je nach Gruppe am 4., 8., 12., 16. und 20. Tag. Die Tiere wurden in Rückenlage fixiert. Nach systemischer Vollheparinisierung

(3000 I.E. Heparin i.v.) und unter Allgemeinnarkose (*siehe Kapitel 4.1.2*) wurde der Gefäßstiel aus Arteria und Vena femoralis im Leistenbereich dargestellt. Arteria und Vena femoralis wurden auseinander präpariert und angeschlungen. Die Arterie wurde anschließend ligiert, eröffnet und katheterisiert (Venen-Katheter, Durchmesser 0,5 x 0,9 mm, Länge 25 cm; B. BRAUN, Melsungen AG, Deutschland). Unmittelbar nach Kanülierung und Unterbindung der proximalen Arterie wurde die Spülung für 30 Minuten mit einer auf 37°C erwärmten Rheomakrodeklösung 10% (Pharmalink, Schweden) bis zum wasserklaren Rückfluss aus der Vena femoralis des Gefäßstieles, durchgeführt. In der Thallium-Szintigraphischen Untersuchung wurden 3 Phasen dargestellt:

Phase 1: Prä-Injektionsmessung der Spritzen

Eine Gammakamera (Picker Dyna DC5, Connecticut) maß über einen ultrafeinen Kollimator (Low-Energy-All-Purpose-Collimator, Nordfort, Connecticut, USA) die radioaktiven Impulse des Thallium-201 Chlorid und wandelte diese über einen Photomultiplier in Impulse für den Rechner um. Initial wurden die Aktivitäten der mit Thallium-201 Chlorid gefüllten Spritzen (Gesamt-Count-Zahl pro Spritze) gemessen. Dadurch konnte ein Korrekturfaktor zwischen den gemessenen Aktivitäten am Aktivimeter (in MBq) und den an der Gammakamera unter den gegebenen geometrischen und gerätetechnischen Verhältnissen (Kollimator, etc.) erzielten Impulsraten gefunden werden. Zugleich wurden sämtliche folgenden Messungen auf diesen "100%-Standard" bezogen.

Phase 2: Dynamische Szintigraphie der Lappenperfusion

Durch die Injektion von ca. 18,3 MBq Thallium 201-Chlorid über den Zugang der Arteria femoralis innerhalb einer Minute verteilte sich das Isotop über den Gefäßstiel und die neugebildeten Gefäße im Hautlappen. Je nach Anzahl der Gefäße verblieb mehr oder weniger Radioaktivität im Lappen, der Rest verteilte sich über die V. femoralis in den gesamten Körper. Unmittelbar nach Injektion des Radiopharmakons folgte die dynamische Datenakquisition. Die dynamischen Aufnahmen teilten sich folgendermaßen auf: 60 Bilder pro 1 sec, dann 45 Bilder pro 2 sec, 25 Bilder pro 30 sec und abschließend 15 Bilder pro 16 sec (Gesamtdauer 30 min). Die Auswertung der dynamischen Szintigraphie erfolgte über ein kommerzielles Programm, das in der klinischen Routine zur Auswertung von Nierenfunktionsszintigraphien (Captopril-

Nierenprotokoll) verwendet wurde. Mit einer Iso-Contour-Technik wurde auf dem 3 Minutenbild eine standardisierte Region of Interest (ROI) definiert, mit deren Hilfe folgende Parameter errechnet wurden:

- + Größe des aktivitätstragenden Areals nach 3 min; Size (pix)
- + Zeitaktivitätskurve mit Bestimmung von:
 - Zeitpunkt der maximalen Aktivität (T_{max} in min)
 - Zeitpunkt der Hälfte der maximalen Aktivität (T_{1/2max} in min)
 - Relative Kurvenhöhe in % der maximalen Aktivität (min)

Phase 3: Spätstatische Aufnahmen der Lappen

In der Auswertung der spätstatischen Aufnahme des Hautlappens wurden die ROI und die Größe des aktivitätsbelegten Areals über der Iso-Count-Linie (50% der maximalen Aktivität) bestimmt. Dabei wurden alle Counts auf die Spritzenaktivität (in % der injizierten Counts) und auf die relative Kurvenhöhe in % des Maximums nach 4 Minuten (rH 4 min), 8 Minuten (rH 8 min) 12 Minuten (rH 12 min) 16 Minuten (rH 16 min) und 20 Minuten (rH 20 min) bezogen.

4.1.5.4. Selektive Mikroangiografie

Bei der untersuchten Gruppe wurde bei allen Tieren die selektive Mikroangiografie zur Auswertung von Geschwindigkeit, Ausdehnung und Form der Neovaskularisation im präfabrizierten Hautlappen unmittelbar nach den szintigraphischen Untersuchungen durchgeführt.

Zur selektiven Mikroangiografie wurde die A. femoralis des implantierten Gefäßstieles durch den kanülierten Katheter von einer körperwarmen Bariumsulfat-Rheomacrodexlösung im Mischungsverhältnis 2 : 1 (Mikropaque 30% : Rheomacrodex = 2 : 1) unter physiologischen Druck von ca. 100 - 120 mmHg für 45 Minuten perfundiert, wobei während der letzten 15 Minuten die V. femoralis abgeklemmt wurde, um eine maximale Perfusion des Mikropaques im Bauchhautlappen zu erzielen.

Nach Euthanasie des Kaninchens mit 160 mg/kg KGW Pentobarbital i.v. (Narcoren®) Merial, Hallbergmoos, Deutschland) wurde der Hautlappen entnommen und einer Röntgenaufnahme (Röntgengerät Nanodor 2, Siemens, München, Deutschland) unterzogen. Die Aufnahmen wurden im standardisierten anterior-posterioren

Strahlengang im Röntgengerät (Radifluor 120 - TORR Philips electronic instrument, München) unter Verwendung eines Kodak-Mammografiefilms (Kodak X: 50 – 24 x 30 cm, Kodak- Pathe, Frankreich) angefertigt. Die Röntgenbilder wurden anschließend über einen Röntgenbildbetrachter optisch dargestellt.

Bei der Kontrollgruppe diente die mikroangiografische Untersuchung zur Bestimmung des originalen vorhandenen Gefäßsystems im Bauchhautlappen.

Bei dieser Gruppe wurde die rechte Arteria carotis und Vena jugularis freipräpariert. Nach der Applikation von 3000 I.E. Heparin (i.v.) wurde in die Arterie ein Kunststoffkatheter (Durchmesser 0,5 x 0,9 mm, Länge 25 cm; B. BRAUN AG, Melsungen, Deutschland) eingeführt und als Perfusionsmedium Ringerlactat 0,9% (DAB 7 Braun) bis zum weitgehend reinen Rückfluss aus der geöffneten Vena jugularis infundiert. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Tiere mit Pentobarbital (Narcoren®, 160 mg/kg i.v. Merial, Hallbergmoos, Deutschland) eingeschläfert. Anschließend wurde eine Mischung aus Bariumsulfat (Micropaque® flüssig, Guerbet, Sulzbach, Deutschland) und Rheomacrodex 10% (Rheomacrodex®, Pharmalink, Schweden) im Mischungsverhältnis 2 : 1 systemisch in den gesamten Tierkreislauf infundiert. Nach Hebung des Bauchhautlappens wurde die weitere Aufarbeitung entsprechend der Untersuchungsgruppe durchgeführt.

Bei den mikroangiografischen Untersuchungen wurden folgende Kriterien bewertet:

- Beurteilung der Lappenvitalität nach Verweilzeiträumen von 4, 8, 12, 16 und 20 Tagen durch die quantitative Auswertung der Anzahl der Gefäße in präfabrizierten Lappen im Vergleich zu der Gefäßanzahl der Kontrolllappen (Referenzgröße = 100%).
- Bestimmung der Richtung, Ausdehnung und Form der Neovaskularisation im präfabrizierten Hautlappen nach Gefäßstielimplantation.
- Vergleich der Neovaskularisationsgeschwindigkeit zwischen den unterschiedlichen Gefäßstielvarianten, um eine Optimierung der Lappenpräfabrikation für die klinische Anwendung zu finden.

Methode zur quantitativen Auswertung der Neovaskularisation

Auf das optimale mikroangiografische Röntgenbild mit der Dimension von 15 x 8 cm des präfabrizierten Hautlappens wurde eine standardisierte selbstgezeichnete Strichplatte mit gleichmäßigen 25 Strichlinien entsprechend der 15 cm Lappenlänge aufgelegt.

Unter Verwendung einer Lupenbrille mit zweifacher Vergrößerung wurde die vertikale Markierung mit einer Nadel entlang der integralen Strichlinie auf eine 0,1 mm dünne DIN A4 (Deutsches Institut für Normung A4) Klarsichtfolie durchgeführt. Jede Markierung bezeichnete den Punkt, wo ein vom Mikropaque perfundiertes Gefäß die Strichlinie gekreuzt hat. Die Gefäßquantifikation im präfabrizierten Hautlappen wurde durch die Zählung der gerichteten Markierungen im Lappen berechnet. Die Quantifizierung wurde für jeden Lappen in der Untersuchungs- und Kontrollgruppe durchgeführt (Abb. 19A).

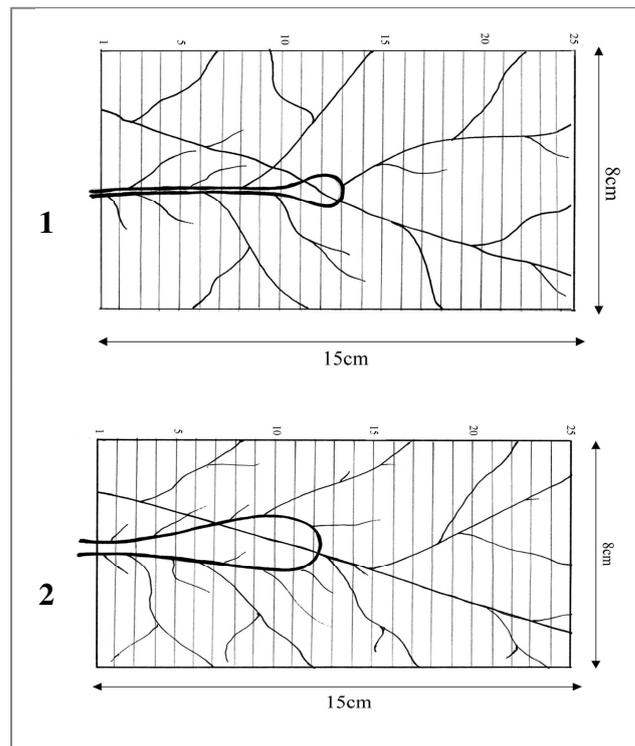


Abb. 19A. Methode zur quantitativen Auswertung der Neovaskularisation im Lappen (1) beim arterio-venösen Gefäßstiel; (2) bei der Gefäßschlinge.

4.1.5.5. Histologische Untersuchungen

Die Hautlappen wurden nach der Angiographie in 6% Formalin für 24 Stunden fixiert und danach in Paraffin eingebettet. Die Schnittebenen für die Histologie sind in der Abbildung 19B dokumentiert.

Die Gewebebereiche wurden mit einem Serienschnittmikrotom Leica® RM 2145 (Leica Mikrosystem, Nussloch, Deutschland) in 7 µm dünne Scheiben geschnitten. Es wurde mit Hämatoxylin-Eosin (HE), Elastica van Gieson (EvG) und Elastica Ladewig (Eldg) Färbungen angefertigt und in 5-, 10-, und 20-facher Vergrößerung (Durchlichtmikroskop, Leitz, Wetzlar, Deutschland) nach folgenden Kriterien untersucht:

- Morphologie der Haut und des Subkutangewebes.
- Morphologie der Gewebezellen im Lappen.
- Morphologie der im Lappen vom Mikropaque gefüllten Gefäße.
- Kapselbildung an der Unterseite des Lappens.

Ebenso wurden in gleicher Weise histologische Untersuchungen der Kontrolllappen zum Vergleich durchgeführt.

Bei den Kontrolllappen wurden Gewebeproben aus äquivalenten Bereichen entnommen, wie oben beschrieben präpariert, geschnitten und ausgewertet.

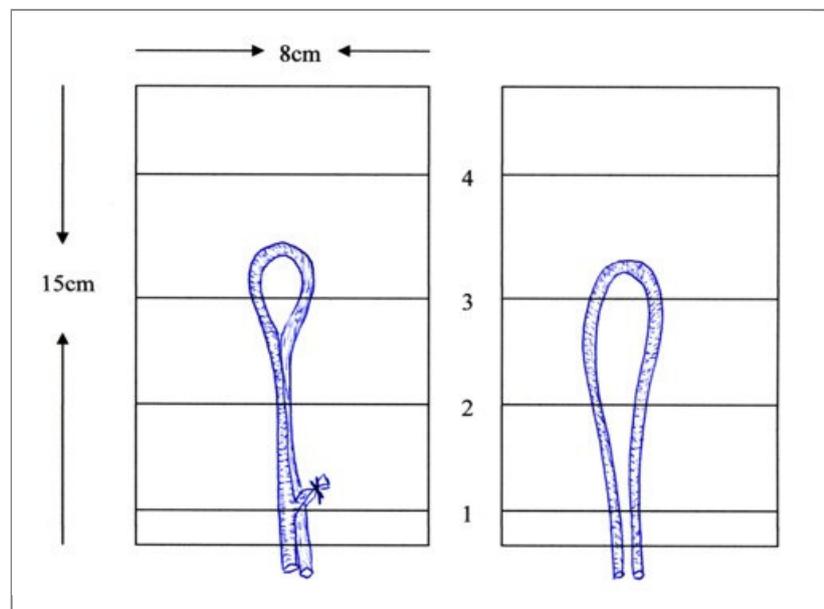


Abb. 19B. Schnittebene der histologischen Präparate (1) Schnitt proximal des Gefäßstiels; (2) Schnitt Mitte des Gefäßstiels; (3) Schnitt distal des Gefäßstiels; (4) Schnitt distaler Lappen (ohne Gefäßstiel).

4.2. STUDIE II: Präfabrizierte Hautlappen in Kombination mit gezüchteten Knorpelzell-Biomaterialkonstrukten

4.2.1. Versuchstier und Knorpelgewinnung

- Versuchstier

Wie in der ersten Studie wurde die Untersuchung an weiblichen Chinchilla-Bastard Kaninchen (Charles River GmbH, D- Sulzfeld) im Alter von 9 - 12 Monaten mit Körpergewichten zwischen 3 – 4,5 kg durchgeführt.

- Knorpelentnahme

Unter Allgemeinnarkose (*siehe Kapitel 4.1.2*) wurde das linke Ohr der Kaninchen sorgfältig geschoren. Nach Desinfektion und steriler Abdeckung erfolgte eine Hautinzision von 5 cm Länge. Nach der Blutstillung und vorsichtiger Abpräparation unter Belassung der Innenhaut des Ohres wurde der Ohrknorpel freigelegt. Anschließend wurde ein Knorpelstück von 2 x 2 cm entnommen (*Abb. 20*) und danach der Hautschnitt mit Nylon der Stärke 4/0 (Ethicon, D- Norderstedt) unter Einzelnahtechnik verschlossen. Als die medikamentöse Nachsorge wurden ein Antibiotikum (Baytril® 5mg/kg, CH- Lyssach) und ein Analgetikum (Buprenorphin 0,05 mg/kg KGW, Temgesic®, Essex, D- München) für 3 Tage postoperativ verabreicht.

4.2.2. In vitro Zellkultivierung und Zell-Biomaterialkonstruktherstellung

4.2.2.1. Zellisolierung und Amplifikation

Zellisolierung: Nach der Explantation wurden die Knorpelstückchen bis zur Zellisolierung in Dulbecco's Medium (Biochrom, D- Berlin) mit 10% fetalem Kälberserum (FCS, Biochrom, D- Berlin) und 20 mg/l Gentamicin (Refobacin®, Merk, D- Darmstadt) aufbewahrt.

Unter sterilen Bedingungen wurde die gereinigte Knorpelbiopsie mit dem Skalpell mechanisch stark zerkleinert (1 mm³) und über 16 Stunden in einer Kulturflasche mit Magnetrührer bei 37 °C im CO₂-Inkubationsschrank enzymatisch verdaut. Die Enzymlö-

sung setzte sich aus Dulbecco's Medium (Biochrom, D- Berlin), DNase II 0,12 mg/ml (Paesel, D- Frankfurt), Hyaluronidase 0,08 mg/ml (Sigma, D- Deisenhofen) und Kollagenase Typ II 16 mg/ml (Biochrom, D- Berlin) zusammen.

Zur Gewinnung einer reinen Zellsuspension wurde die gesamte Verdauungslösung gefiltert. Dazu wurden Filter mit einer Porengröße von 70 µm verwendet (Falcon, USA-New Jersey). Die enzymatische Restaktivität der Suspension wurde durch die Zugabe von DMEM gestoppt. Die Zellen werden durch Zentrifugation (1000 rpm) für 10 Minuten vom Medium getrennt und das hierdurch erzeugte Zellpellet wurde mit Vollmedium resuspendiert. Nach der Zellsuspensionphase wurden die isolierten Chondrozyten zur Bestimmung von Vitalität und Zellzahl durchgeführt.

Die Vitalität der Chondzyten wurde durch die Färbung mit Fluoreszin-Diazetat (FDA, 25 mg/ml in Aceton, D- Sigma) und Propidium Jodid (PI, 1 mg/ml destilliertes H₂O₂, D- Sigma) untersucht. Bei intakten Zellmembranen wurde FDA von Esterasen metabolisiert und die Zellen deshalb grün gefärbt. Avitale Zellen wurden durch zerstörte Zellmembranen und Bindung an die DNA dadurch rot gefärbt. Die Gesamtzellzahl wurde mit Hilfe der Zählkammer (Madaus, D- Köln) unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Ungefähr 300.000 bis 400.000 Zellen wurden pro Biopsie gewonnen.

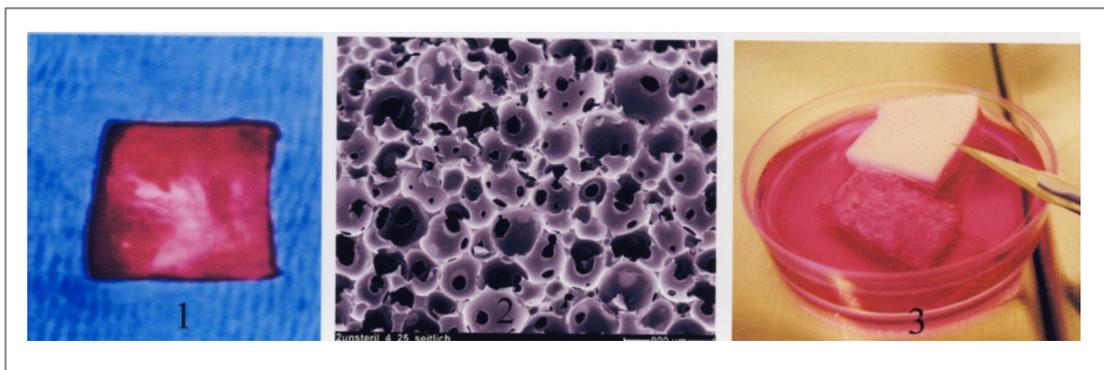


Abb. 20. In vitro Versuchsablauf: (1) Knorpelprobe aus dem Ohr (2x2cm). (2) Elektronenmikroskopische Aufnahme von Polycaprolacton in Form eines porösen Trägers. (3) In vitro Herstellung von gezüchteten Knorpelzellen-Konstrukten.

Monolayerkultur und Amplifikation: Die isolierten Chondrozyten wurden in einer Konzentration von 30.000 Zellen/cm² in Kulturflaschen (Becton Dickinson, D- Heidelberg) bei 37°C und 5,5% CO₂ kultiviert. Nach dem Anheften der Zellen wurde das DMEM-Nährmedium (Dulbecco Modified Eagle Medium) mit Zusatz von 4,5 g/l D-Glucose,

1,028 g/l Glutamin, 3,7g/l NaHCO₃, 40 mg/l Gentamicin (Refobacin®, Merck, D- Darmstadt) und 10% FCS (Biochrom, D- Berlin), 2 - 3 mal pro Woche gewechselt.

Bei Konfluenz wurden die Zellen nach dreimaliger PBS-Waschung (Phosphate Buffered Saline) mit einem Gemisch aus Trypsin und EDTA (0,05% und 0,02%) (Biochrom, D- Berlin) abgelöst und wieder in einer Ausgangskonzentration von 30.000/cm³ ausgesät. Die Vermehrungsphase betrug ca. zwei Wochen und beinhaltete im Durchschnitt 3 - 4 Passagen.

4.2.2.2. Zellträgermaterial

Unter Berücksichtigung der Kriterien hoher Biokompatibilität, Bioresorbierbarkeit, und guter Adhäsionskapazität mit langer Degradationzeit und hohem interkonnektivem Porennetzwerk (bis zu 90%) wurden poröse Zellträger, bestehend aus Polycaprolacton (Polyesterurethan, PCL-Diol, PolyMaterials AG, D- Kaufbeuren), als Biomaterialkonstrukte in unserer Studie verwandt (*siehe Kapitel 2.3*). Dieses Material wurde konventionell mit Dampf sterilisiert (*Abb. 20*).

4.2.2.3. Einbau gezüchteter Knorpelzell-Biomaterialkonstrukte

Die Zellen aus der Monolayerkultur wurden auf eine Konzentration von 30×10^6 Zellen/ml DMEM / prozentualen Anteil eingestellt. Anschließend wurden die 2 cm x 2 cm x 0,5 cm großen Zellträger aus Caprolacton mit ca. 20×10^6 Zellen/cm³ Trägermaterial besiedelt. Nach drei Stunden wurden die so besiedelten Konstrukte mit DMEM-Nährmedium überschichtet und im Brutschrank circa 5 Tage bis zur Implantation kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag. Es wurden drei besiedelte Knorpelzell-Biomaterialkonstrukte für die Implantation und ein Konstrukt ohne Zellen als Kontrollgruppe angefertigt (*Abb. 20*).

4.2.3. In vivo Versuchablauf

4.2.3.1. Präfabrikation vom Bauchhautlappen

Aufgrund der in den Vorversuchen gewonnenen Erkenntnisse erfolgte die Hautlappenpräfabrikation entsprechend dem Modell 2 (dargestellte Variante mit endständiger mikrovaskulärer arterio-venöser Anastomose), mit dem eine erfolgreiche Neovaskulari-

sation mit verkürztem operativen Zeitaufwand und einem einfachen und stabilen Gefäßstiel bewiesen worden war.

Die Operationsvorbereitung, Anästhesie, Lappenpräfabrikation und Gefäßstielherstellung wurden in gleicher Weise mit dem Modell 2 durchgeführt (siehe Kapitel 4.1.2 und 4.1.3).

4.2.3.2. Implantation gezüchteter Knorpelzell-Biomaterialkonstrukte

Nach der Gefäßstielimplantation und Fixierung am Bauchhautlappen wurden die drei *in vitro* gezüchteten Knorpelzell-Biomaterialkonstrukte an der Unterseite des präfabrizierten Lappens implantiert, wobei zwei Knorpelzell-Biomaterialkonstrukte auf der lateralen und medialen Seite des implantierten Gefäßstiels und ein Knorpelzell-Biomaterialkonstrukt direkt auf dem implantierten Gefäßstiel platziert wurde. Zusätzlich wurde ein Biomaterialkonstrukt ohne Zellen als Kontrolle am distalen Teil des Lappens implantiert (Siehe Abb. 21).

Nach Implantation von gezüchteten Knorpelzell-Biomaterialkonstrukten und der Kontrolle im Lappen wurde die Wunde schichtweisen (Vicryl 3/0 und Nylon 3/0, Ethicon, D-Norderstedt) wie oben beschrieben verschlossen.

Postoperative Medikamente wurden in gleicher Weise wie bei der Herstellung von präfabrizierten Hautlappen verabreicht (siehe Kapitel 4.1.4).

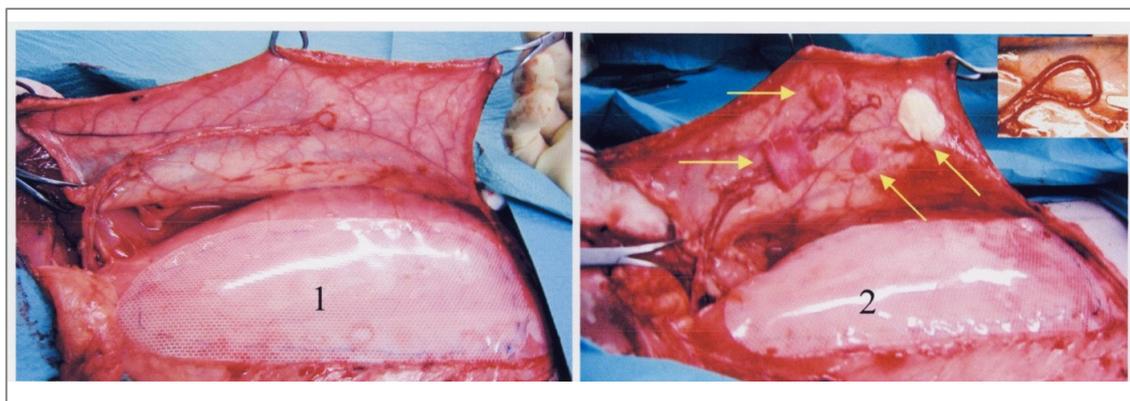


Abb. 21. Schematische Darstellung des *in vivo* Versuchsablaufs: (1) Implantation des arteriovenösen Gefäßstiels mit endständiger Anastomose; (2) Implantation von gezüchteten Knorpelzell-Biomaterialkonstrukten und Kontrolle ohne Zellen im Lappen.

4.2.4. Beobachtungszeitraum

Der Beobachtungszeitraum dieser Studie betrug 6 Wochen. Nach Ablauf dieser Verweilzeit wurden die kombinierten Gewebelappen aus gezüchteten Knorpelzell-Biomaterialkonstrukten und der Lappenpräfabrikation gemäß nach den folgenden Untersuchungsparametern beurteilt:

4.2.5. Untersuchungsparameter

4.2.5.1. Makroskopische Beurteilung und freie mikrovaskuläre Transplantation

Neben der makroskopischen Beurteilung der Vitalität wurde die freie mikrochirurgisch Transplantationsmöglichkeit von den kombinierten Konstrukt-Bauchhautlappen evaluiert. Der präfabrizierte Bauchhautlappen wurde nach 6 Wochen unter Erhalt des implantierten Gefäßstieles in gleicher Dimension und Lappendesign umschnitten und als freier Lappen gehoben. Diese kombinierten neovaskularisierten Bauchhautlappen mit gezüchteten Knorpelzell-Biomaterialkonstrukten wurden danach wieder in situ aufgelegt und der implantierte Gefäßstiel des Lappens mikrochirurgisch re-anastomosiert. Nach der freien Lappentransplantation wurde der Bauchhautlappen mit den gezüchteten Knorpelzell-Biomaterialkonstrukten auf Vitalität, Farbe, Aussehen, Kongestion sowie potentielle Nekrosen untersucht.

4.2.5.2. Selektive Mikroangiographie

Die selektive mikroangiographische Darstellung wurde genau wie im Kapitel 4.1.5.4 durchgeführt. Wichtige Untersuchungsparameter bei der selektiven Mikroangiographie waren neben der Untersuchung der Form und Anzahl des neuen Gefäßsystems im präfabrizierten Bauchhautlappen, die Neovaskularisierung und der Gefäßverlauf in den gezüchteten Knorpelzell-Biomaterialkonstrukten.

4.2.5.3. Histologische und immunhistochemische Untersuchung

Nach der Angiographie wurden konventionelle Histologie und Immunhistochemie durchgeführt.

- **Histologische Untersuchung:** Die konventionelle Histologie wurde genau wie im Kapitel 4.1.5.5 durchgeführt. Wichtig hierbei war es, dass die Entnahmestellen entsprechend den eingebrachten gezüchteten Knorpelzell-Biomaterialkonstrukten erfaßt wurden. Bei der konventionellen Histologie sollten neben der Morphologie des präfabrizierten Hautlappens, Stabilität, Formbeständigkeit, Gewebeintegration und Degradation der Konstrukte sowie die Neovaskularisierung in den gezüchteten Knorpelzell-Biomaterialkonstrukten untersucht werden.

- **Histochemische Untersuchung:** Zum Nachweis der Knorpelentwicklung mit Knorpelmatrix wurde eine Alcianblaufärbung verwendet.

Nach der Explantation wurden die Biomaterialkonstrukte mit flüssigem Stickstoff eingefroren, um immunhistochemische Färbungen durchzuführen. Nach der Fixierung in gepuffertem Formol (Merck, D- Darmstadt) für 15 Minuten wurden die Schnitte kurz mit destilliertem Wasser gespült und mit Alcianblaulösung (Chroma, D- Köngen) für 60 Minuten gefärbt. Nach nochmaligem Spülen mit destilliertem Wasser erfolgte die Gegenfärbung der Zellkerne mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat (Chroma, D- Köngen) für 15 Minuten. Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe und in Xylol (Merck, D- Darmstadt) entwässert und in Eukitt (Kindler, D- Freiburg) eingebettet.

5. ERGEBNISSE

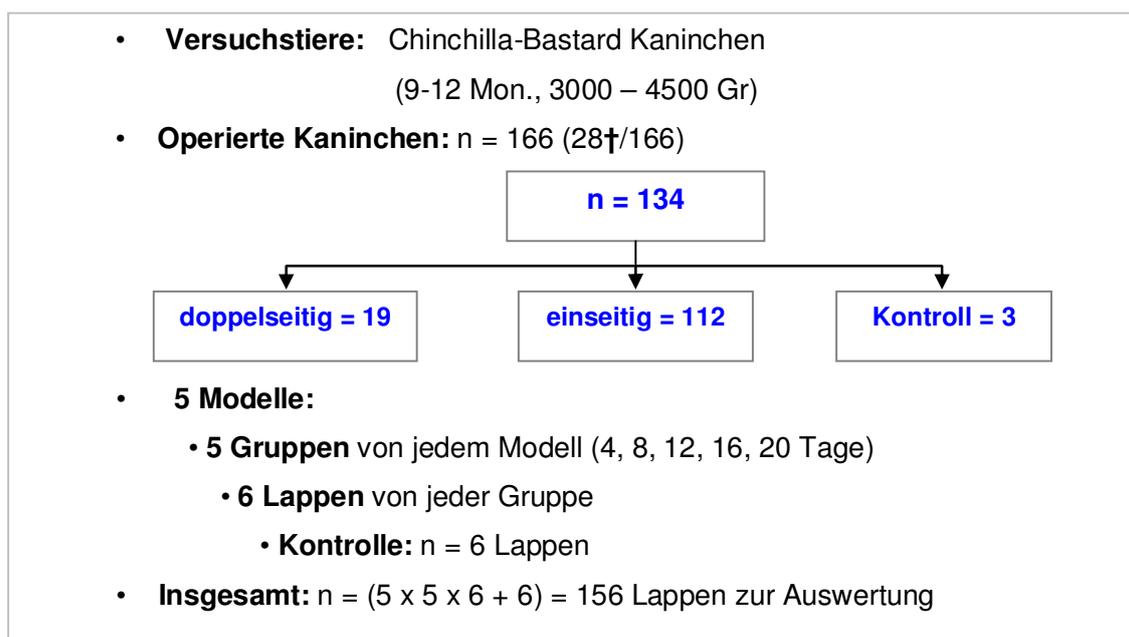
5.1. STUDIE I: Neovaskularisation in präfabrizierten Hautlappen

Insgesamt 166 Kaninchen wurden in dieser Studie operiert. Von den operierten Tieren starben 28 Kaninchen während der intraoperativen Narkose (n=11), eines wegen einem postoperativ ausgebildeten Hämatomes (7), und eines ohne erkennbare äußerliche Ursache im Tierstall (10). In der Expander-Gruppe konnten 4 Kaninchen aufgrund von Thrombosen im implantierten Gefäßstiel als Komplikation der Expansion nicht ausgewertet werden. Bei einem Tier waren die femoralen Gefäße nicht ausgebildet, so dass die Operation abgebrochen werden musste.

Von den 166 eingesetzten Kaninchen gelangten 134 Tiere zur kompletten Auswertung. Von den 134 untersuchten Kaninchen wurden 19 Tiere doppelseitig, 112 Tiere einseitig und 3 Tiere in der Kontrollgruppe operiert.

Für jeden Beobachtungszeitraum von 4, 8, 12, 16 und 20 Tagen standen 6 Lappen für das jeweilige Modell (Modell 1 bis Modell 5) zur Verfügung. Insgesamt wurden 150 Lappen in den Untersuchungsgruppen ausgewertet. Zum Vergleich mit der Untersuchungsgruppe wurden 6 entsprechende Lappen (an 3 Kaninchen) in der Kontrollgruppe beurteilt (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht über operierte Versuchstiere und Versuchslappen in der Studie I



5.1.1. Makroskopische Beurteilungen und gestielte Lappentransplantation

- Allgemeiner Zustand

Bei keinem der operierten Kaninchen war unmittelbar postoperativ das Allgemeinbefinden gestört. Die meisten Tiere nahmen spätestens einen Tag postoperativ Wasser und am zweiten Tag Futter auf. Von den 131 untersuchten Tieren zeigten 10 Tiere während der ersten drei postoperativen Tage einen schlechten Allgemeinzustand mit vermindertem Fressverhalten. Nach der Infusion von Ringerlactatlösung (DAB7 Braun, 60 ml x 2-mal/täglich s.c.) normalisierte sich der Allgemeinzustand dieser Tiere wieder.

- Vitalität und Wundheilung des Lappens nach Präfabrikation

Bei allen Versuchstieren war das Aussehen der Lappen postoperativ unauffällig. Farbe und Behaarung waren in allen Beobachtungszeiträume normal. Nach einer Woche postoperativ wuchsen die Haare auf dem Lappen wie an anderen Hautbereichen des Körpers. Die Wundränder waren gut verwachsen und die Heilungen erschienen unauffällig (*Abb. 22*). Gelegentlich wurden nach ein oder zwei Wochen p.o. kleine lokale Wundrandnekrosen von etwa 1 x 2 cm aufgrund der Manipulation durch Kratzen der Tiere beobachtet. Diese traten vor allem im Bereich der Wundkanten auf und hatten keine Auswirkung auf die Gesamtvitalität des Lappens.

Bei dem Modell 5 (Expandergruppe) war der Expander nach 16 Tagen mit dem maximalen Endvolumen von 250 ml gefüllt worden. Der Lappenflächengewinn hatte zu diesem Zeitpunkt zu einer durchschnittlichen Lappengröße von 13 x 16 cm geführt. In dieser Gruppe zeigte sich bei einem Tier eine partielle Nekrose von 2 x 3 cm am Wundrand des Oberschenkels (*Abb. 22*).

- Kapselneubildung an der Unterseite des präfabrizierten Hautlappens

Bei allen Versuchstieren zeigte sich in der 4-Tage-Gruppe eine sehr geringe Kapselneubildung zwischen Silikonfolie (oder Expander) und Hautlappen. Diese Kapselneubildung nahm mit der Zeit schnell zu und war nach 8 und 12 Tagen p.o. deutlich erkennbar. Bei der 16- und 20-Tage-Gruppe ließ sich bei Entnahme eine deutliche Kapselbildung feststellen. Durch diese Kapsel wurde der präfabrizierte Lappen glatt begrenzt, wobei der implantierte Gefäßstiel komplett von dem Lappen und dem

fibröses Gewebe der Kapsel eingehüllt war (Abb. 23).



Abb. 22. Makroskopische Aufsicht der Lappenvitalität nach 20 Tagen p.o. (1): Modell 1 (Ligatur) und Modell 2 (Anastomose); (2): Modell 5 (Expander).

- Serom und Infektion:

In allen Modellen bildete sich bei den 12-, 16- und 20-Tage-Gruppen lokal zwischen Lappen und Silikonfolie/Expander häufig ein geringes Serom von 2 ml bis 5 ml. Bei drei Hautlappen der 20-Tage-Gruppe im Modell 5 (Expandergruppe) bestand eine entzündliche Veränderung als Ausdruck einer Gewebereaktion, möglicherweise wegen dem Expanderdruck. Abszessbildungen und ausgedehnte Nekrosen waren bei keinem Versuchstier nachweisbar.

- Vitalität der gehobenen Insellappen

Bei 6 Kaninchen (je 3 Lappen für das Modell 2 und Modell 3) wurden die Insellappen durch Umschneidung in gleicher Dimension und Design unter Erhalt des neu implantierten Gefäßstiels gehoben. Bei allen gehobenen Insellappen zeigte sich an den ersten zwei Tagen p.o. eine geringe venöse Kongestion mit der Rötung und Schwellung am Bauchhautlappen. Diese Kongestion bildete sich jedoch danach spontan zurück. Unauffällige postoperative Farbe, Aussehen, Haarwachstum und Wundheilung am Lappenrand über einen Beobachtungszeitraum von 2 Wochen wurde bei allen diesen gehobenen Insellappen festgestellt (Abb. 24).

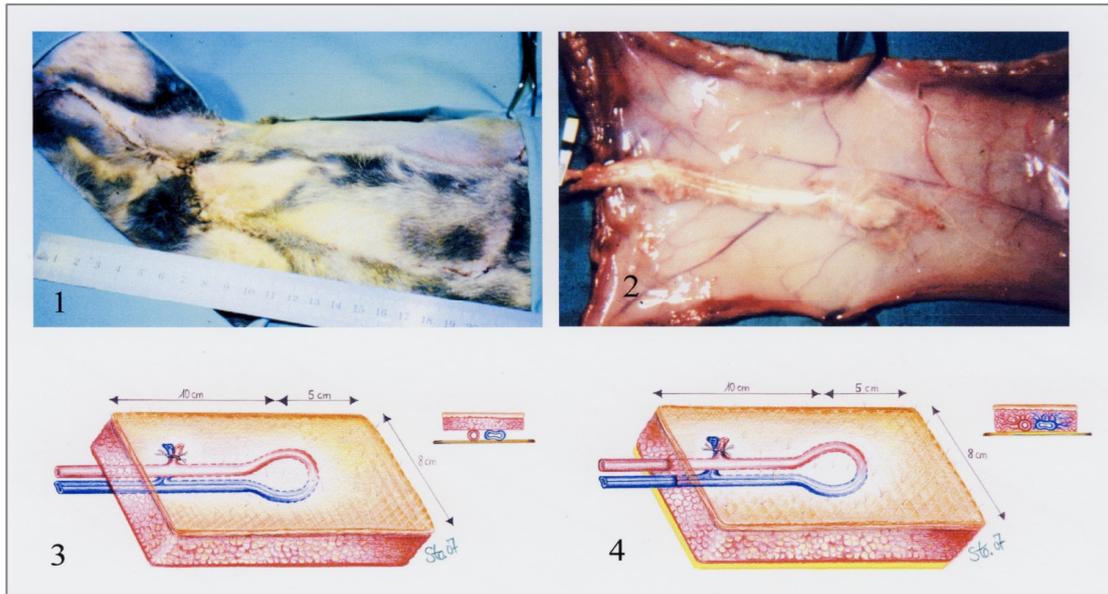


Abb. 23. Darstellung der Kapselneubildung an der Unterseite des Lappens. (1 und 2): In vivo makroskopische Beurteilung des Modells 2 nach 8 Tage p.o.; (3 und 4): Schematische Illustration von intra- und postoperativem Situs.

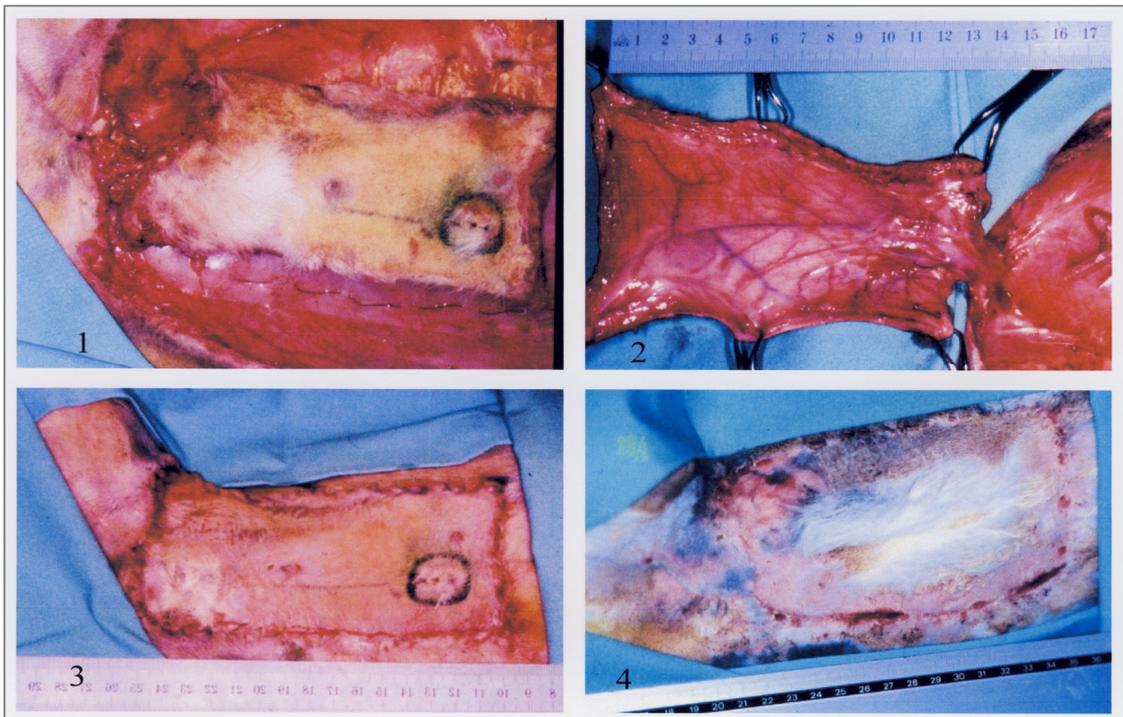


Abb. 24. Vitalität des präfabrizierten Bauchhautlappens: (1) Lappenumschneidung, (2) Hebung als Insellappen, (3) in situ Rückverlagerung (4) normale Wundheilung mit unauffälliger Farbe und Haarwachstum auf dem Hautlappen im Verlauf.

5.1.2. Blutbilduntersuchungen:

Die Blutwerte wurden präoperativ und postoperativ (am Tötungstag) bestimmt.

- Die klinisch-chemischen Daten lagen präoperativ bei allen Versuchstieren im Normbereich. Eine deutliche Veränderung dieser Werte war postoperativ bei keinem Versuchstier nachweisbar.

- Hämatologische Daten waren bei allen Versuchstieren präoperativ unauffällig. Bei den meisten Versuchstieren zeigte sich postoperativ eine leichte Anämie mit Absenkung der WBC, RBC, HGB, HCT und Blutzellen wie Lymph, MID, GRAN. Im Vergleich zu den Normalwerten wiesen jedoch MCV, MCH, MCHC keine Veränderung auf.

5.1.3. Szintigraphische Untersuchungen

Die dynamische Szintigraphie mit Th-201 Chlorid konnte aus technischen Gründen nur bei dem Modell 1 (Ligatur), Modell 2 (Anastomose) und Modell 5 (Expander) durchgeführt werden. Die Parameter, welche die Zeitaktivitätskurve (ZA-Kurve) beschrieben sowie die Größe des aktivitätstragenden Gewebes nach 3 Minuten von unterschiedlichen Modellen sind in den Tabellen 2, 3 und 4 zusammengefasst.

Tabelle 2: Größe des aktivitätstragenden Gewebes 3 Minuten p.i. und Parameter der Zeitaktivitätskurve beim Modell 1 (A.V. Ligatur) in Abhängigkeit von der Zeit nach Gefäßstielimplantation.

Gruppe	Size (pix)	Tmax	T1/2 max	rH4	rH8	rH12	rH16	rH20	75%Tmax
4 Tage	186	1,33	26	61	58	55	54	54	22
8 Tage	232	1,44	58,6	82	79,66	78,33	76,66	75,66	36
12 Tage	238,5	1,4	67	82,5	81,5	80,5	78,5	77,5	822
16 Tage	265,5	1,53	-	89	87,5	87	86	86	-
20 Tage	294,75	1,5	54,2	80	77,25	74,25	71,75	69,5	222

Size.: Größe des aktivitätstragenden Areals 3 min p.i. (pix)

Tmax.: Zeitpunkt des Maximums der Zeitaktivitätskurve (min)

T1/2 max.: Zeitpunkt des Abfalls der ZA-Kurve auf 50% des Maximums (min.)

rH (min.): Relative Höhe der Zeitaktivitätskurve in % nach 4, 8, 12, 16, 20 min.

Tabelle 3: Größe des aktivitätstragenden Gewebes 3 Minuten p.i. und Parameter der Zeitaktivitätskurve beim Modell 2 (A.V. Anastomose) in Abhängigkeit von der Zeit nach Gefäßstielimplantation.

Gruppe	Size (pix)	Tmax	T1/2 max	rH4	rH8	rH12	rH16	rH20	75%Tmax
4 Tage	187	1,33	0,3	28	26	25	26	25	12
8 Tage	218,7	1,35	37,53	73,75	71,75	70	68,75	68,25	98,5
12 Tage	244,6	1,49	43	90,33	86,66	82	78,33	75,33	929
16 Tage	263,3	1,28	53,4	84,16	80,83	78,33	76,16	74,83	835,25
20 Tage	228,5	1,25	31,5	73,5	70	64,5	61,5	58	110

Size.: Größe des aktivitätstragenden Areals 3 min p.i. (pix)

Tmax.: Zeitpunkt des Maximums der Zeitaktivitätskurve (min)

T1/2 max.: Zeitpunkt des Abfalls der ZA-Kurve auf 50% des Maximums (min)

rH (min.): Relative Höhe der Zeitaktivitätskurve in % nach 4, 8, 12, 16, 20 min.

Tabelle 4: Größe des aktivitätstragenden Gewebes 3 Minuten p.i. und Parameter der Zeitaktivitätskurve beim Modell 5 (Expander) in Abhängigkeit von der Zeit nach Gefäßstielimplantation.

Gruppe	Size (pix)	Tmax	T1/2 max	rH4	rH8	rH12	rH16	rH20	75%Tmax
4 Tage	187	1,33	0,5	26	23	25	25	24	11,1
8 Tage	250,3	1,4	41,5	60,8	69,2	67,4	66,3	66,1	102,6
12 Tage	273,8	1,5	48,2	86,3	85,4	84,2	77,8	80	940
16 Tage	276,4	1,3	61,6	72,0	78,4	74,6	75,2	78,4	837,2
20 Tage	230	1,2	56,8	62,0	68,7	59,8	57,6	54,5	103

Size.: Größe des aktivitätstragenden Areals 3 min p.i. (pix)

Tmax.: Zeitpunkt des Maximums der Zeitaktivitätskurve (min)

T1/2 max.: Zeitpunkt des Abfalls der ZA-Kurve auf 50% des Maximums (min)

rH4 (min.): Relative Höhe der Zeitaktivitätskurve in % nach 4, 8, 12, 16, 20 min.

Thallium-201 ist ein Zyklotronprodukt, welches durch Elektroneneinfang mit einer physikalischen Halbwertszeit von 73 Stunden zu Quecksilber-201 (Hg-210) zerfällt.

Abbildung 25 und Abbildung 26 zeigen die Anreicherung des Radiopharmakons im Lappen 3 und 30 Minuten p.i. bei den Gruppen 4, 8, 12, 16 und 20 Tage der endständigen Ligatur (Modell 1) und endständigen Anastomose (Modell 2) nach Gefäßstielimplantation.

- Perfusionsphase

Bis zu 3 Minuten p.i. wurde die Verteilung des Radiopharmakons bei allen Modellen im wesentlichen durch die Gefäßversorgung bestimmt und war damit hauptsächlich auf den implantierten Gefäßstiel beschränkt. Zu allen Beobachtungszeiträumen floss die Aktivität durch endständige A. und V. Anastomose (Modell 2 und Modell 5) beschleunigt gegenüber endständiger A. und V. Ligatur (Modell 1) ab, was sich in einem raschen Abfall der Zeitaktivitätskurve und entsprechend niedrigen Werten für die oben dargestellten und in der Tabelle 2, 3 und 4 aufgeführten Parameter niederschlug.

Als Beispiel sei die Abbildung 27 der Zeitaktivitätskurven (ZA-Kurve) der Th-Szintigraphie 8 Tage p.o. aufgeführt: Das linksseitige Diagramm stellt die Anflutungsphase während der ersten 60 Sekunden dar und spiegelt damit vor allem die gleichmäßige Injektion des Tracers über beide Lappen (grün: A.V. Ligatur; rot: A. V. Anastomose). Das rechtsseitige Diagramm gibt den Verlauf der Zeitaktivitätskurve über 30 Minuten wieder. Bei beiden Lappen wurde innerhalb der ersten Minuten das Kurvenmaximum erreicht. Bei der A.V. Anastomose (Modell 2) kam es zu einem raschen Abfall (Abfluss der Aktivität über die Anastomose) während bei der A.V. Ligatur der Tracer im Gefäßstiel verblieb, was sich in einem nur sehr langsamen Abfall der ZA-Kurve widerspiegelt.

Bei der Expandergruppe (Modell 5) erfolgte die Abflutung schneller und deutlich verstärkt im Vergleich zum Modell 2, besonders in den Untersuchungszeiträumen 16 und 20 Tage (siehe Tabelle 4).

- Anreicherungsphase (Vitalitätsphase):

Um die in den spätstatischen Aufnahmen 32 Minuten p.i. bzw. in den letzten Zeitframes der dynamischen Aufnahme (30 min p.i.) nachweisbaren Counts bzw. die Größe der dann verbliebenen aktivitätstragenden Region zwischen verschiedenen Modellen vergleichen zu können, wurden diese Parameter auf die 3 Minuten p.i. verbliebene Akti-

vität normiert, um der unterschiedlichen Verfügbarkeit des Radiopharmakons Rechnung zu tragen. 30 min p.i. bestand ein deutlicher Unterschied der verbliebenen Aktivität zwischen verschiedenen Modellen sowie zwischen den unterschiedlichen Untersuchungszeiträumen.

Bei den Gruppen 8, 12 und 16 Tage p.o. nahm die perfundierte Fläche (*Abb. 26*) und die normierte verbliebene Impulszahl klar mit der Verweilzeit der Gefäßstielimplantation zu. Hier war beim Modell 2 und Modell 5 (endständige A.V. Anastomose) eine größere Fläche aktivitätsbelegt, was einem besseren Einwachsen entsprach, anbei übertraf jedoch die Expandergruppe die Foliengruppe durchweg deutlich. Zwanzig Tage p.o. nahm der präfabrizierte Lappen vollständig Aktivität auf. Zu diesem Zeitpunkt war zwischen allen Modellen kein signifikanter Unterschied mehr feststellbar.

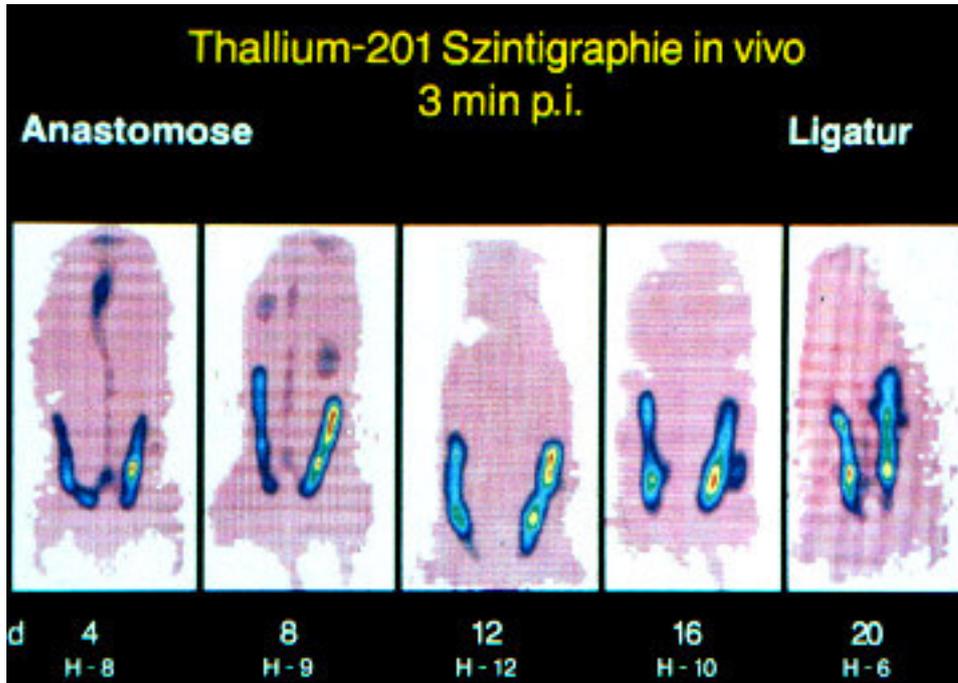


Abb. 25: Die Anreicherung der Th-201 Szintigraphie, 3 Minuten nach Infusion des Radiopharmakons in vivo in den Untersuchungszeiträumen 4, 8, 12, 16 und 20 Tage [rechtes Abdomen: Modell 1 (Ligatur); linkes Abdomen: Modell 2 (Anastomose)].

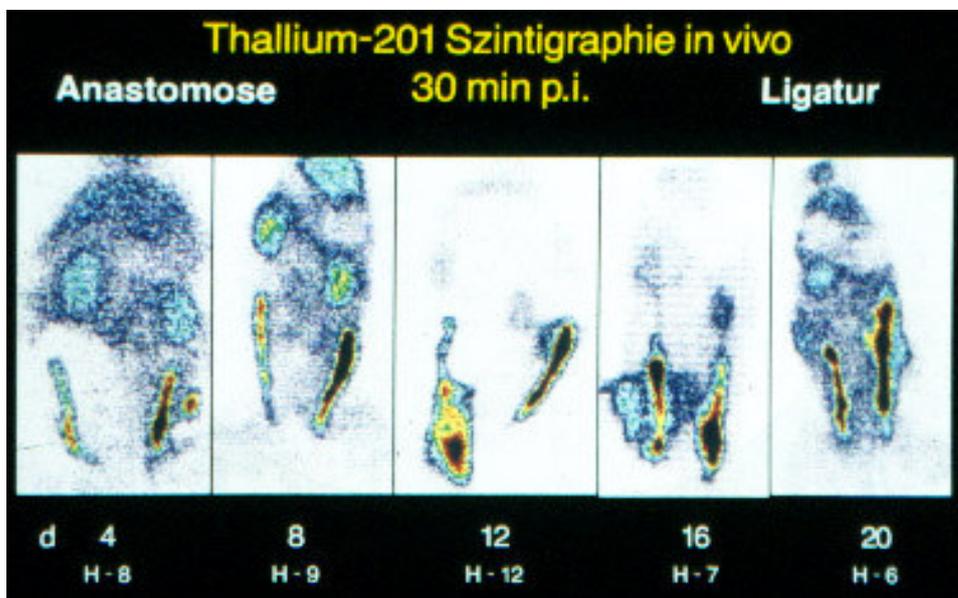


Abb. 26: Die Anreicherung der Th-201 Szintigraphie, 30 Minuten nach Infusion des Radiopharmakons in vivo in den Untersuchungszeiträumen 4, 8, 12, 16 und 20 Tage. [rechtes Abdomen: Modell 1 (Ligatur); linkes Abdomen: Modell 2 (Anastomose)].

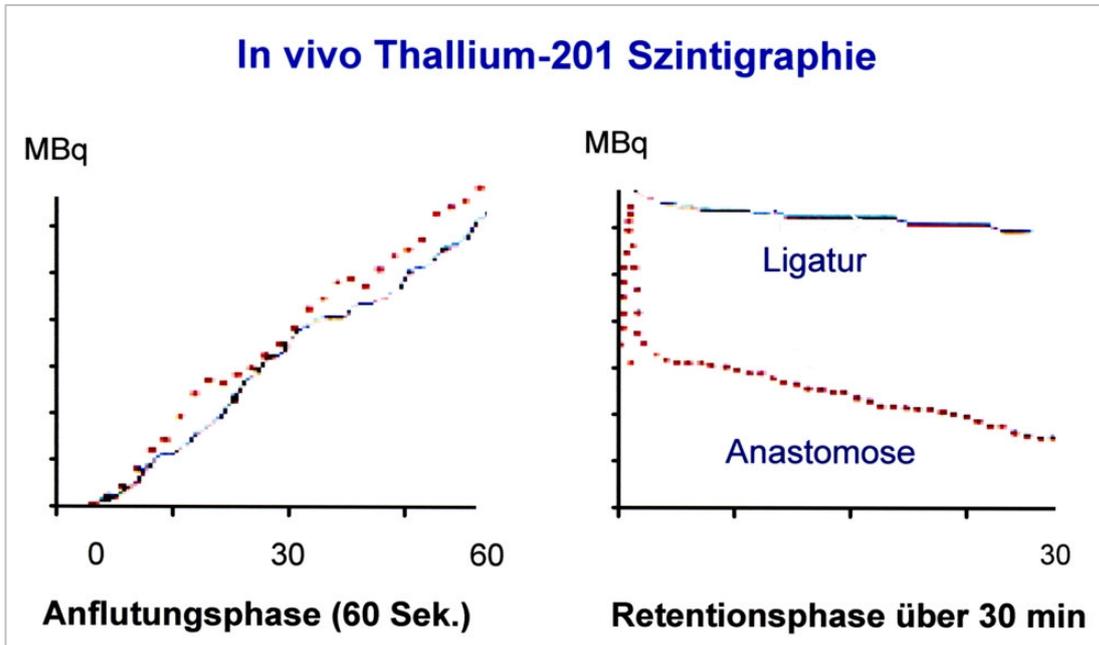


Abb. 27: Szintigraphische Darstellung, Anflutungs- und Retentionsphase der Th-201 Szintigraphie im Lappen durch die relative Kurvenhöhe (rH) zum Zeitpunkt 4, 8, 12, 16 und 20 Minuten.

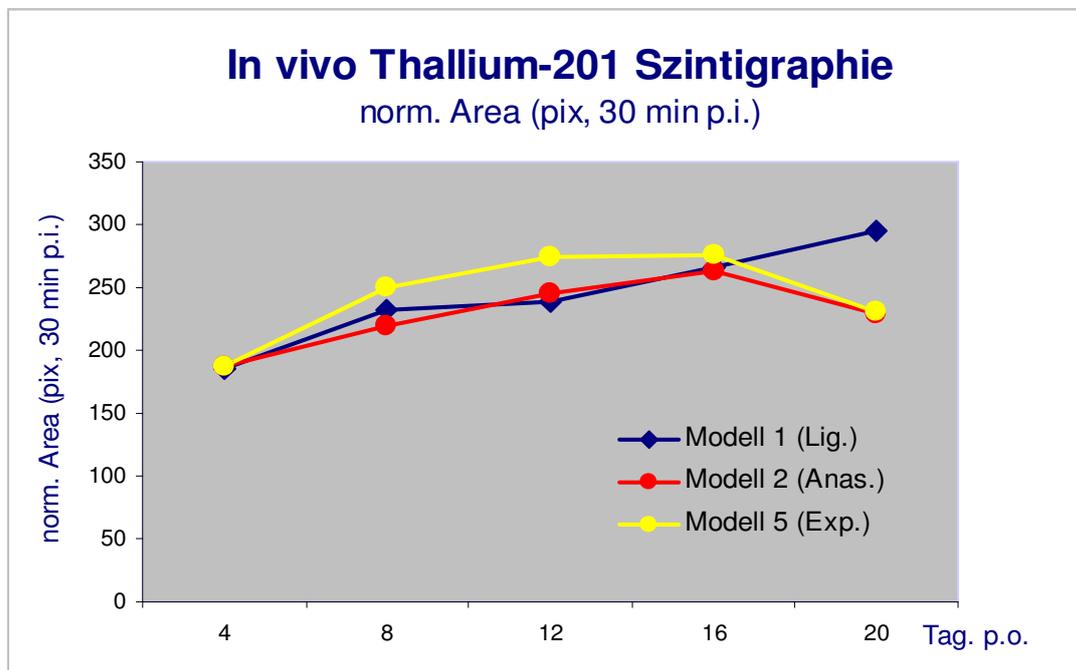


Abb. 28: Szintigraphische Darstellung, Anreicherung der Th-201 Szintigraphie im Lappen 32 Minuten nach Infusion der Aktivität (norm. Area. pix. 32 min. p.i.) in den Beobachtungszeiträumen 4, 8, 12, 16 und 20 Tagen.

5.1.4. Selektive mikroangiographische Untersuchungen

Zum Definieren der Richtung, Ausdehnung und Formen der Neovaskularisation im präfabrizierten Bauchhautlappen wurde bei allen Versuchstieren die selektive Mikroangiographie entsprechend der jeweiligen Untersuchungszeiträume von 4, 8, 12, 16 und 20 Tagen durchgeführt. Mit Hilfe der selektiven Mikroangiographie lässt sich durch Auszählen der kontrastmittelgefüllten Gefäße eine quantitative Aussage der Lappenperfusion der jeweiligen Untersuchungszeiträume machen.

Die Tabelle 4, 5 und Abbildung 29 zeigen die quantitativ gewonnenen Werte und Standardabweichungen der Gefäßauszählung im präfabrizierten Hautlappen mit Hilfe der Integralstrichplatte aus allen Untersuchungsgruppen der einzelnen Modelle im Vergleich mit der Kontrollgruppe.

- Gruppe 4 Tage:

Die mikroangiographische Darstellung der 4-Tage-Gruppe (*Abb. 30*) zeigte bei allen untersuchten Modellen keinen Gefäßanschluss zwischen implantiertem Gefäßstiel und vorhandenem Gefäßsystem im Lappen. In nur wenigen Bildern (vom Modell 1 bis Modell 5) waren sehr feine, aus dem implantierten Gefäßstiel in die Umgebung verlaufende Gefäße nachweisbar. Die prozentuellen Werte der ausgezählten Gefäße lagen zwischen 0,8% (Modell 4) bis 1,7% (Modell 3) im Vergleich zur Kontrollgruppe (100%).

- Gruppe 8 Tage:

In den selektiven mikroangiographischen Bildern der 8-Tage-Gruppe (*Abb. 31*) zeigten sich deutlich neue, aus dem implantierten Gefäßstiel zum Lappen aussprossende Gefäße. Viele kleine Gefäße kamen zur Darstellung und in manchen Fällen, insbesondere bei den Modellen mit maximalem Blutfluss des implantierten Gefäßstiels (Modell 2 – 5), waren sie bereits mit dem lokal vorhandenen Gefäßsystem im Lappen verbunden. Zu diesem Zeitpunkt übertraf die Neovaskularisation beim Modell 5 (Expander-Modell) aus der Mikroangiographie signifikant die anderen Variante. Die Zahl der Gefäßneubildungen beim Modell 1 (Ligatur), mit minimalem Blutfluss des Gefäßstiels war deutlich niedriger. Beim Modell 1 waren Gefäßanschlüsse mit dem lokalen Gefäßsystem nicht nachweisbar.

Entsprechend den selektiven mikroangiographischen Bildern zeigten sich quantitativ im Vergleich mit der Kontrollgruppe (=100%): Modell 1: 4,3%; Modell 2: 27,1%; Modell 3: 35,5%; Modell 4: 28,7% und Modell 5: 47%.

- Gruppe 12 Tage:

Die Neovaskularisation im präfabrizierten Hautlappen in der 12-Tage-Gruppe (*Abb. 32*) war bei allen untersuchten Modellen ausgeprägter als in der 8-Tage-Gruppe.

In der 12-Tage-Gruppe waren sichtbare Neugefäßaussprossungen deutlich größer und dichter geworden. Mit maximalem Blutfluss des implantierten Gefäßstiels (bei den Modellen 2 – 5) erfolgten zahlreiche Anschlüsse der neuen Gefäßaussprossungen mit dem bereits im Lappen bestehenden Gefäßsystem. Demgegenüber war beim Modell 1 (mit minimalem Blutfluss) nur eine geringe Anzahl von neuen Gefäßaussprossungen sowie nur ein minimaler Anschluss an das bestehende Gefäßsystem nachweisbar.

Die quantitative Auszählung der vom Kontrastmittel im präfabrizierten Lappen angefüllten Gefäße betrug: Modell 1: 8,9%; Modell 2: 36,7%; Modell 3: 44,1%; Modell 4: 41%; Modell 5: 55,2% (Kontrollgruppe = 100%)

- Gruppe 16 Tage:

Die mikroangiographische Darstellung der 16-Tage-Gruppe (*Abb. 33*) zeigte, dass bei allen Modellen neue Gefäßaussprossungen mit verschiedenen Gefäßgrößen und zahlreichen Anschlüsse mit originalem Gefäßsystem im Lappen sich kontinuierlich entwickelt hatten. Beim Modell 1 (minimaler Blutfluss) zeigte sich im Vergleich zu den Ergebnissen von 12 Tagen ein signifikanter Sprung der Neovaskularisation mit zahlreichen neuen Gefäßaussprossungen und Gefäßanschlüssen. Durch die Konnexion zwischen Gefäßaussprossungen und dem bereits im Lappen vorhandenen Gefäßsystem wurde ein großer Teil des präfabrizierten Lappens zu diesem Zeitpunkt vom neuen implantierten Gefäßstiel gut perfundiert.

Die quantitativen Auszählungen der Neovaskularisation im Lappen ergaben folgende Prozentwerte: Modell 1: 62,5%; Modell 2: 77,4%; Modell 3: 73,3%; Modell 4: 75,1%; Modell 5: 99,6%.

- Gruppe 20 Tage:

Mikroangiographien der 20-Tage-Gruppe (Abb. 34) zeigten, dass die Gefäßzahl und das Gefäßmuster nach 20 Tagen bei allen Modellen nahezu identisch mit dem Bild der Kontrolllappen waren. Die Lappenperfusion resultierte nun aus Gefäßverbindungen zwischen neugebildeten Gefäßen und dem im Lappen bereits bestehenden Gefäßsystem.

In diesem Zeitpunkt stellte sich kein signifikanter Unterschied der Neovaskularisation zwischen verschiedenen Modellvarianten mehr dar. Eine ausreichende, der physiologischen Perfusion entsprechende Durchblutung des gesamten Lappens durch den implantierten Gefäßstiel ist somit nach 20 Tage anzunehmen.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe (Zahl der Gefäße = 100%) betragen die Prozentwerte der im Hautlappen vom implantierten Gefäßstiel perfundierten Gefäße bei Modell 1: 98,7%; Modell 2: 108,6%; Modell 3: 105,6%; Modell 4: 108,8%; Modell 5: 113,6%.

Tabelle 5: Mittelwerte und Prozente der ausgezählten Gefäße bei allen untersuchten Modellen nach den verschiedenen Verweilzeiten des implantierten Gefäßstieles von 4, 8, 12, 16 und 20 Tage im Vergleich mit der Kontrollgruppe (100%).

Modell Gruppe	Modell 1 (Lig.)		Modell 2 (Anast.)		Modell 3 (isol. Vene)		Modell 4 (isol. Art.)		Modell 5 (Exp.)		Kontrolle	
	Anz	%	Anz	%	Anz	%	Anz	%	Anz	%	Anz	%
4 Tage	3	1,3	3,3	1,4	2,6	1,7	1,3	0,8	3,3	1,4	238,8	100
8 Tage	10,2	4,3	64,8	27,1	84,5	35,5	67,1	28,7	112,3	47		
12 Tage	21,3	8,9	87,7	36,7	107,9	44,1	99,7	41,0	131,8	55,2		
16 Tage	149,8	62,7	185	77,4	175,1	73,3	179,8	75,1	237,8	99,6		
20 Tage	235,8	98,7	259,5	108,6	252,3	105,6	258	108,8	271,3	113,6		
Anzahl der Lappen	30 (6 Lap x 5G.)		30 (6 Lap x 5G.)		30 (6 Lap x 5G.)		30 (6 Lap x 5G.)		30 (6 Lap x 5G.)		6	

Anz : Absolute Anzahl der Gefäße
 % : Anzahl der Gefäße in Prozent
 6 Lap x 5G.: je 6 Lappen x 5 Gruppe

Lig: Endständige Ligatur
 Anast: Endständige Anastomose
 isol. Vene: Venöse Gefäßschlinge

isol. Art: Arterielle Gefäßschlinge
 Exp: Gefäßstiele mit Expandern.

Tabelle 6: Standardabweichungen und Prozente der ausgezählten Gefäße

Modell Gruppe	Modell 1 (Lig.)		Modell 2 (Anast.)		Modell 3 (isol. Vene)		Modell 4 (isol. Art.)		Modell 5 (Exp.)		Kontrolle	
	Sd	%	Sd	%	Sd	%	Sd	%	Sd	%	Sd	%
4 Tage	1,6	0,4	2,3	0,6	0,09	3,5	0,12	9,2	1,7	52	13	5,5
8 Tage	6,2	1,7	34,6	9,6	11,8	13,8	16,4	24,5	28,7	25,5		
12 Tage	16,2	4,5	55,5	15,3	14,8	13,2	6,2	6,3	14,0	10,7		
16 Tage	43,1	11,9	42	11,6	19,1	11	17,6	9,7	35,4	14,8		
20 Tage	38,6	10,6	51,2	14,1	21,4	8,5	11,9	4,6	35,0	12,8		
Sig.	P < 0,05		P < 0,05		P < 0,05		P < 0,05		P < 0,05		P < 0,05	

Sd : Standardabweichungen der Gefäße.
 %: Prozent der Standardabweichung.
 Sig: Signifikant unterschiedlich.

Lig: Endständige Ligatur
 Anast: Endständige Anastomose.
 isol. Vene: Venöse Gefäßschlinge.

isol. Art: Arterielle Gefäßschlinge.
 Exp: Gefäßstiele mit Expandern.

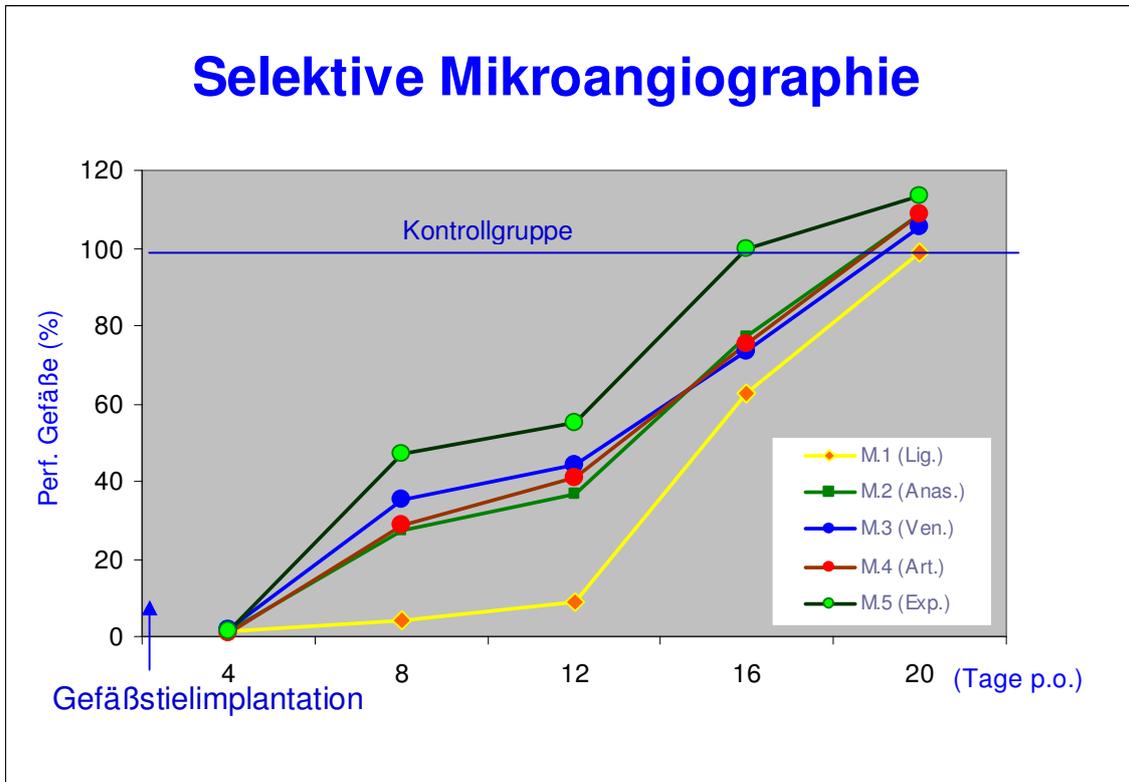


Abb. 29. Graphische Darstellung der Neovaskularisation im präfabrizierten Hautlappen nach Gefäßstielimplantation in den Beobachtungszeiträumen von 4, 8, 12, 16 und 20 Tagen bei verschiedenen Modellvarianten im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Perf. Gefäße (%): Perfundierte Gefäße im Lappen im Prozentwert

- M.1 (Lig.): Modell 1 (endständige Ligatur)
- M.2 (Anas.): Modell 2 (endständige Anastomose).
- M.3 (Ven.): Modell 3 (isolierte arterialisierte venöse Gefäßschlinge).
- M.4 (Art.): Modell 4 (isolierte arterielle Gefäßschlinge).
- M.5 (Exp.): Modell 5 (arterio-venöse Gefäßstiel mit Gewebe-Expander).

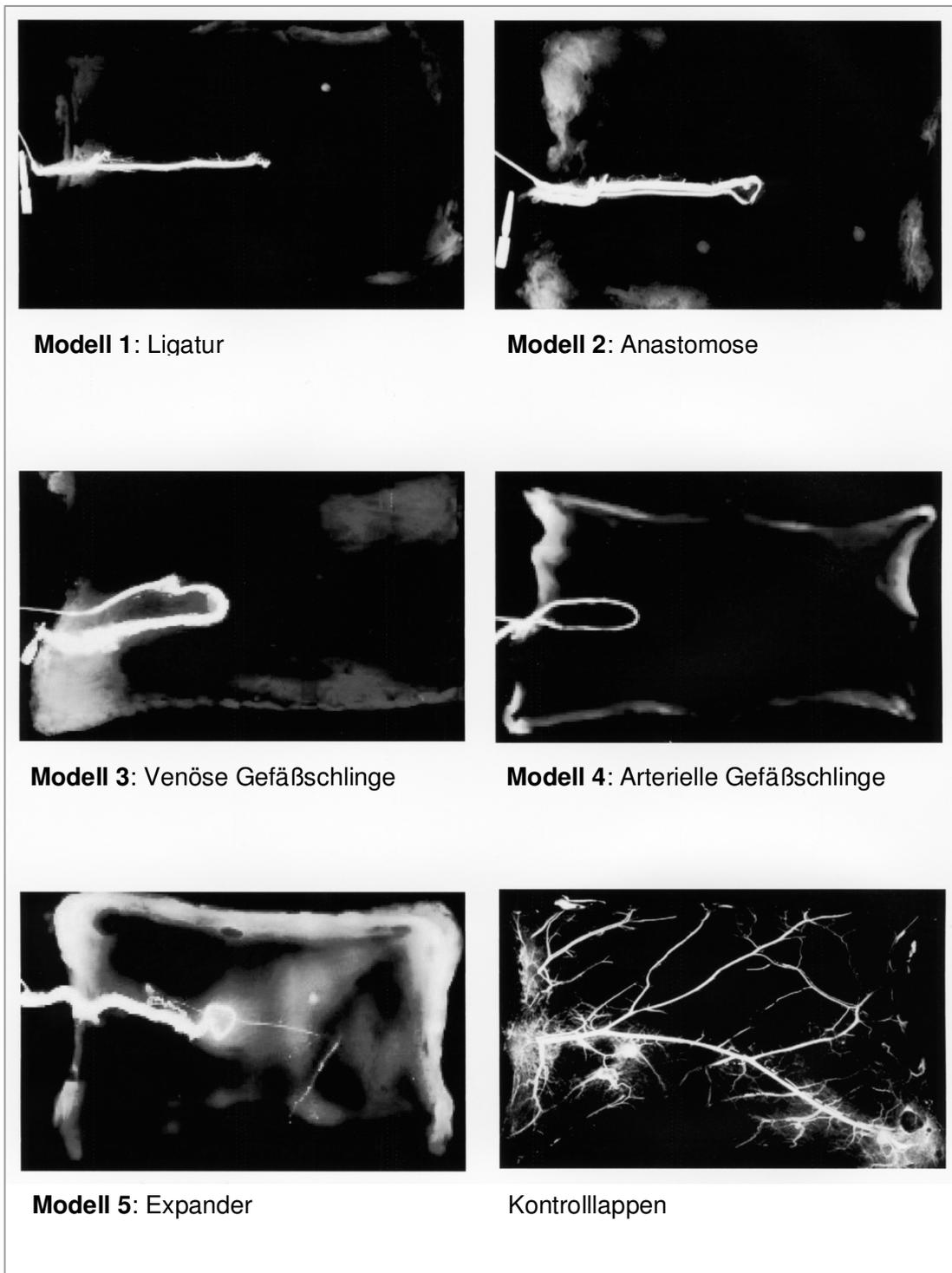


Abb. 30. Selektive Mikroangiographie der Gruppe 4-Tage für alle Modellvarianten im Vergleich mit der Kontrollgruppe.

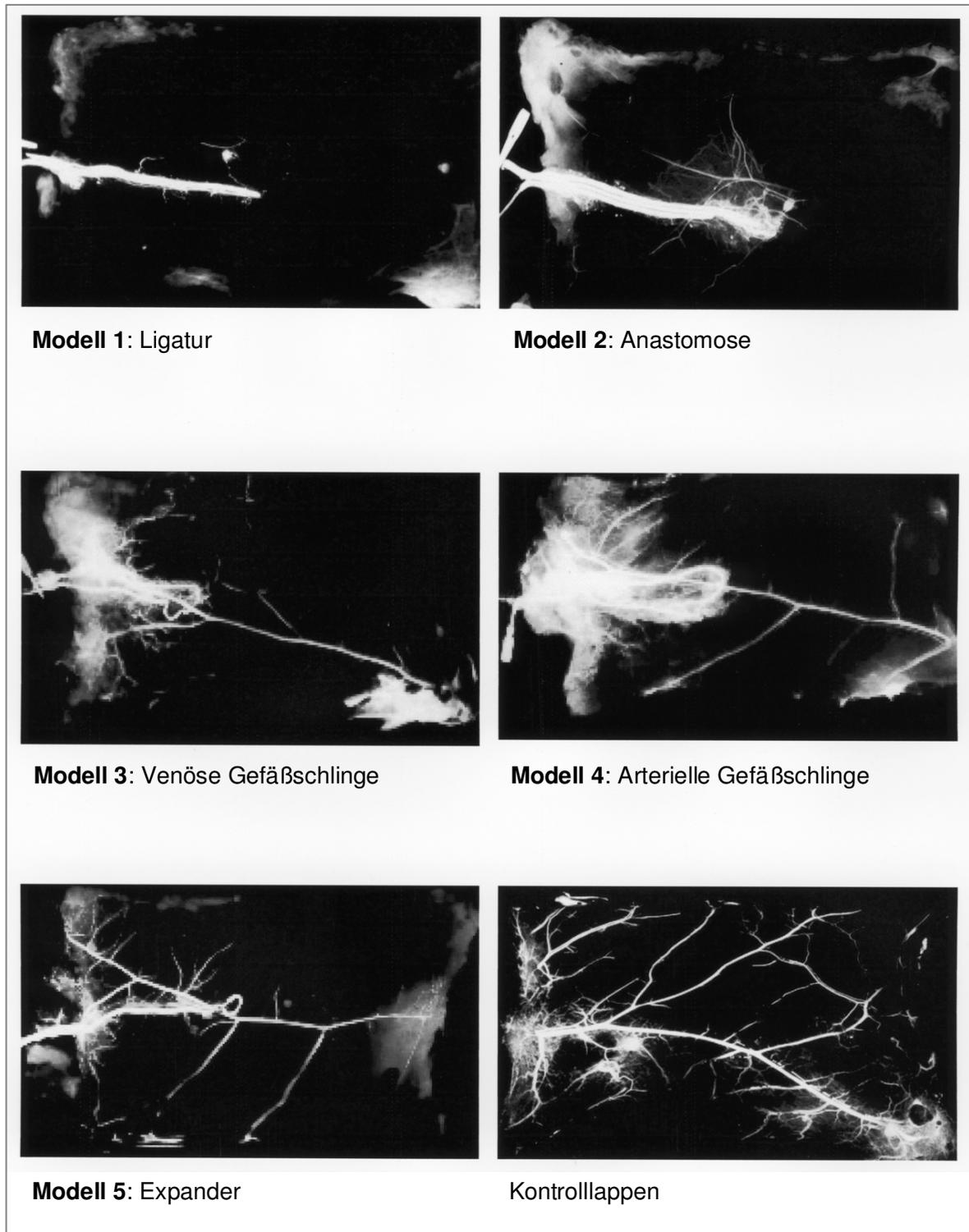


Abb. 31. Selektive Mikroangiographie der Gruppe 8-Tage für alle Modellvarianten im Vergleich mit der Kontrollgruppe.

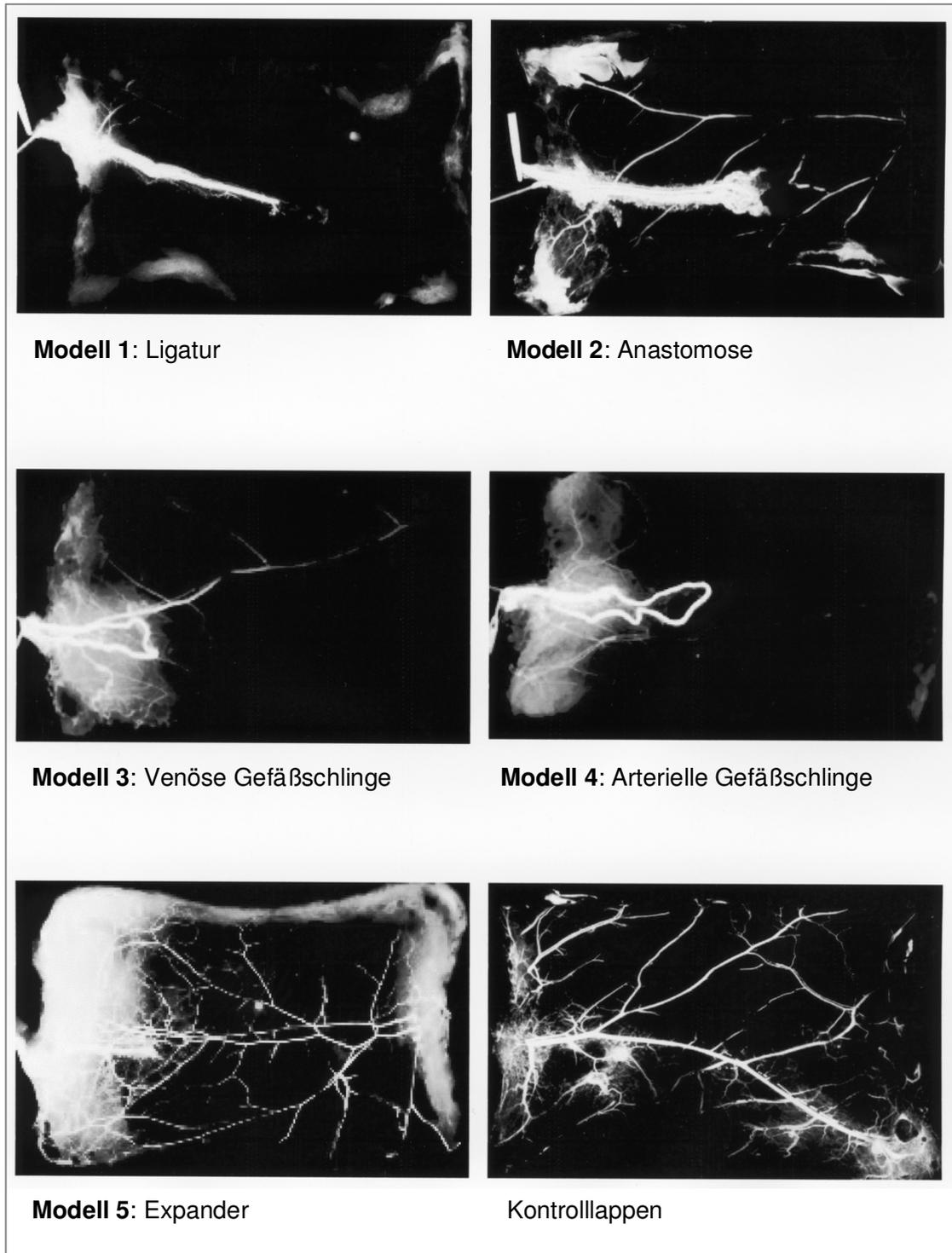


Abb. 32. Selektive Mikroangiographie der Gruppe 12-Tage für alle Modellvarianten im Vergleich mit der Kontrollgruppe.

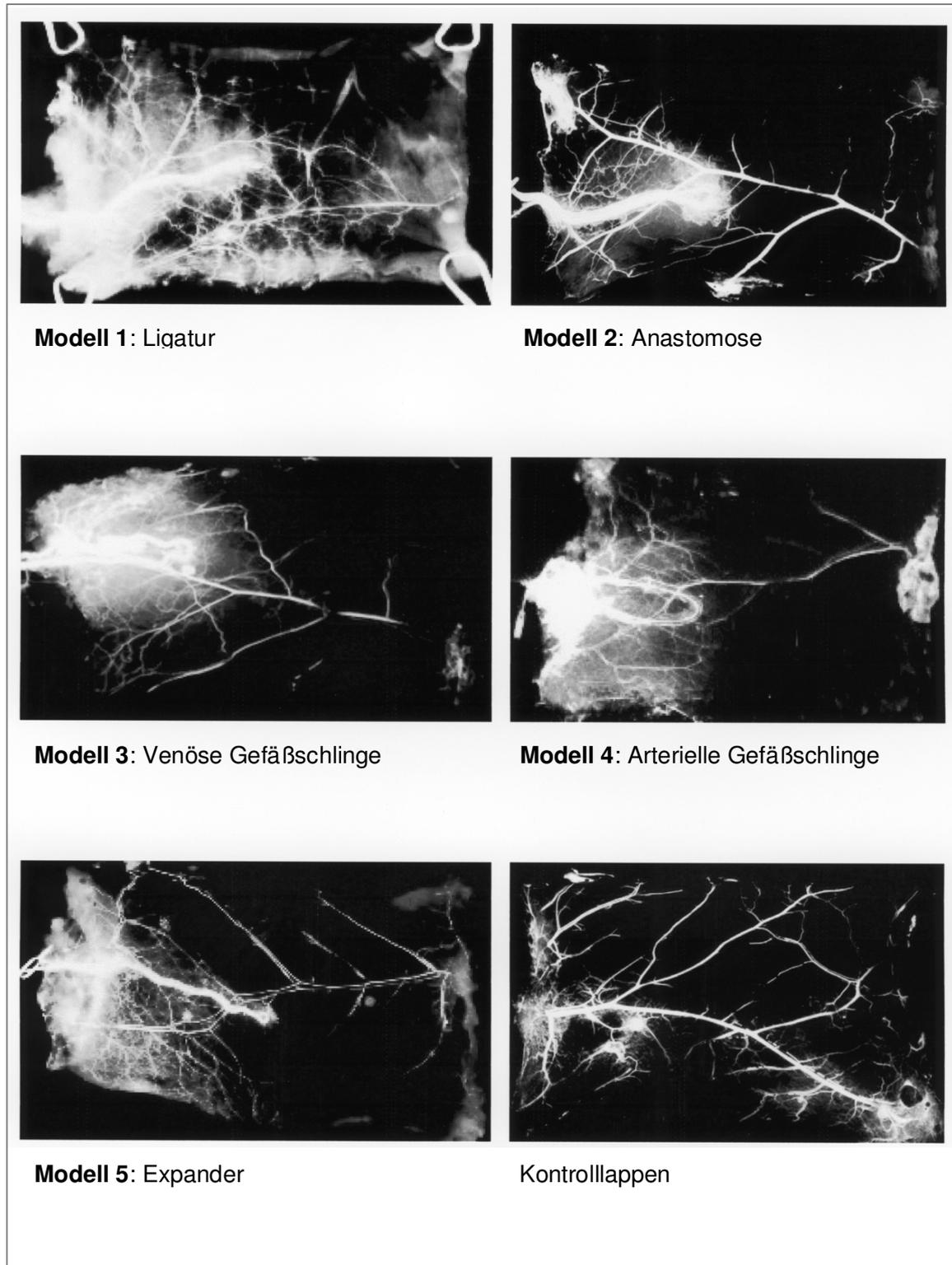


Abb. 33. Selektive Mikroangiographie der Gruppe 16-Tage für alle Modellvarianten im Vergleich mit der Kontrollgruppe

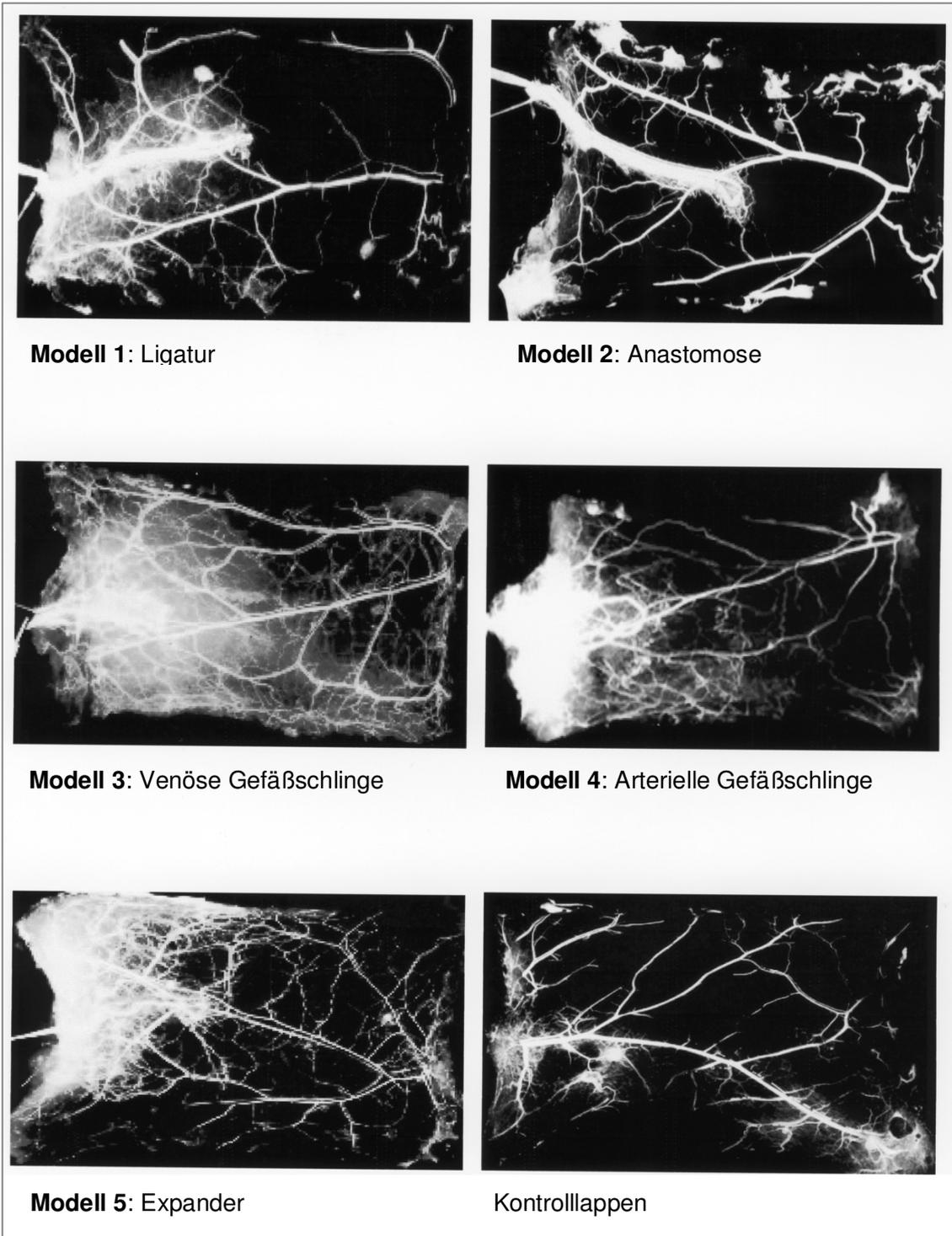


Abb. 34. Selektive Mikroangiographie der Gruppe 20-Tage für alle Modellvarianten im Vergleich mit der Kontrollgruppe.

5.1.5. Histologische Untersuchungen:

Histologische Untersuchungen wurden bei allen Versuchslappen durchgeführt.

- Morphologie der Haut und des Subkutisgewebes:

Die bereits im Kapitel 5.1.1 beschriebenen Bilder der makroskopisch vitalen Bauchhautlappen wurden durch die histologischen Untersuchungen bestätigt. Die Morphologie der Haut in allen Beobachtungszeiträumen von 4, 8, 12, 16 und 20 Tagen erschien in allen Präparaten intakt und vital (*Abb. 35-39*). In der HE -, EvG -, und Eldg-Färbung fand sich eine intakte Epidermis mit mehrschichtigem verhornenden Plattenepithel. Auch das darunter liegende Stratum zeigte einen vitalen, regelrechten Zustand und ragte der physiologischen Anatomie entsprechend mit seinen zapfenförmigen Schleifen als Bindegewebepapillen in die Vertiefungen der Epidermis hinein. Hier fanden sich auch zahlreiche intakte Haarfollikel, Muskelschicht, Gefäße und Bindegewebeschicht, die das Bild eines vitalen Hautlappens vervollständigten.

Beim Modell 5 (Expander) konnte eine leichte Abnahme des subkutanen Fetts und Muskulatursehicht bei der 16- und 20-Tage-Gruppe histologisch beobachtet werden. Das subkutane Fettgewebe wurde allerdings teilweise durch Kollagenfasern ersetzt.

- Kapselneubildung:

Bei allen untersuchten Modellen konnte die Kapselneubildung an der Unterseite der Präparate, zwischen Lappen und Silikonfolie (oder Expander) 4 Tage p.o. noch nicht deutlich erkannt werden. Nach 8 bis 12 Tagen bestand jedoch an der Unterfläche des Lappens bereits eine Kapselneubildung mit 4 - 8 linear organisierten Fibrozytenschichten und Kollagenfasern. Diese Kapselneubildung war mit zunehmender Verweilzeit dicker und stärker geworden. In den Zeiträumen der 16 und 20 Tage nahm die Anzahl der Schichten bis auf durchschnittlich 15 bis 20 Schichten zu. Durch diese Kapselneubildung wurden der Lappen und der implantierte Gefäßstiel miteinander verbunden, so dass der Gefäßstiel zwischen Lappen und Kapselneubildung zu liegen kam (*Abb. 35-39*).

- Implantierter Gefäßstiel:

Da unter den gegebenen technischen Bedingungen die Präparate nur in einer Breite von 1,5 cm bis maximal 2 cm zu schneiden waren, wurde beim Modell 3 (venöse

Gefäßschlinge) und Modell 4 (arterielle Gefäßschlinge) oftmals lediglich ein Teil der implantierten Gefäßschlinge dargestellt.

In den oben beschriebenen Schnittebenen (*Siehe Abb. 19*) waren bei allen Modellvarianten sowohl das Lumen der Arterie und Vene als auch der perivaskulären Umgebungsgefäße deutlich intakt mit Mikropaque gefüllt erkennbar. Die implantierten Gefäßstiele zeigten ein unauffälliges morphologisches Muster.

Bei maximalem Blutfluss im implantierten Gefäßstiel (Modelle 2 – 5) hatte die Venenwand des implantierten Gefäßstiels bei den Beobachtungszeiträumen 16 und 20 Tagen etwas an Stärke zugenommen.

- Vitalität des präfabrizierten Hautlappens

Durch die Anreicherung des Kontrastmittels über die neuen Gefäßaussprossungen zum Lappen ließ sich im Wesentlichen die Blutperfusion aus dem neuen implantierten Gefäßstiel bestätigen. Die Lokalisationen der mit dem Röntgenkontrastmittel Bariumsulfat gefüllten Gefäße waren aufgrund der braunen, wolkigen und leicht fluoreszierenden Darstellung unter dem Lichtmikroskop leicht auszumachen.

Bei der 4-Tage-Gruppe (*Abb. 35*) waren nur die Gefäße des perivaskulären Gewebes und Vasa vasorum mit Mikropaque gefüllt. Die Zahl der vom Mikropaque gefüllten Gefäße im Lappen waren mit der Verweilzeit von 8, 12 und 16 Tage nach Gefäßstielimplantation signifikant ausgeprägter. In den 20-Tage-Gruppen wurde das Gefäßnetz des gesamten Hautlappens bei allen Modellvarianten vom Kontrastmittel ausgefüllt (*Abb. 36-39*).

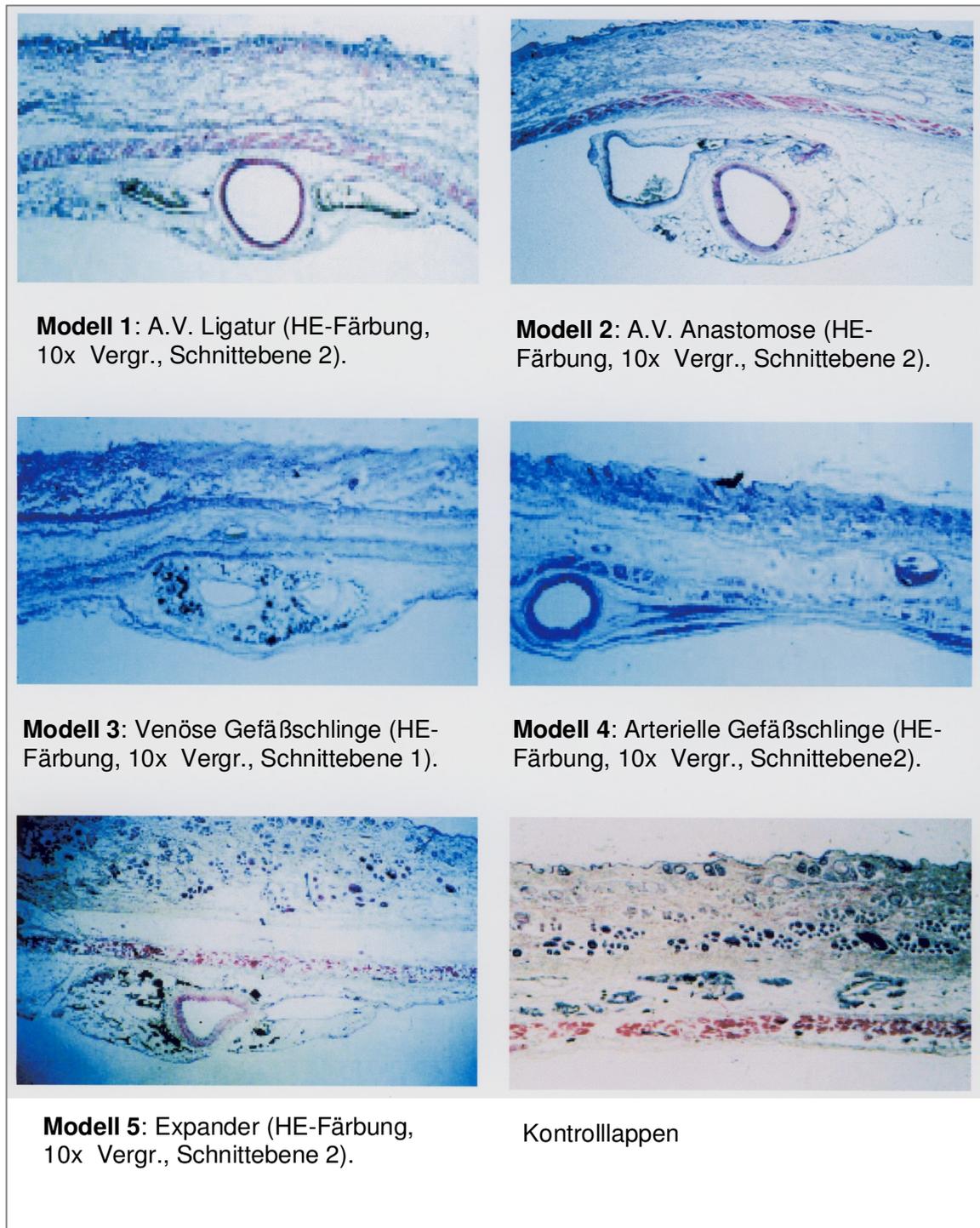


Abb. 35. Histologie der Gruppe 4-Tage von allen Modellen.

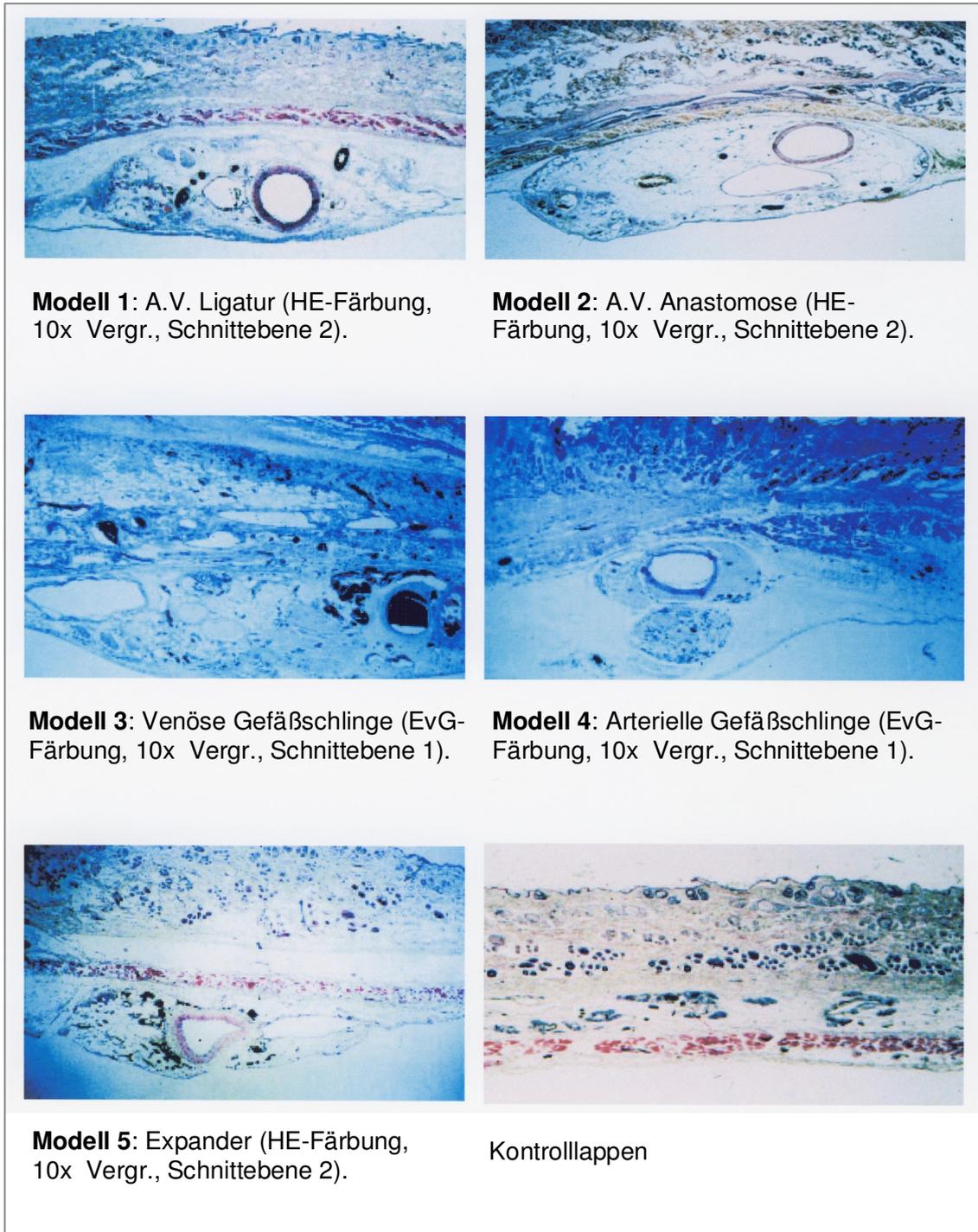


Abb. 36. Histologie der Gruppe 8-Tage von allen Modellen.

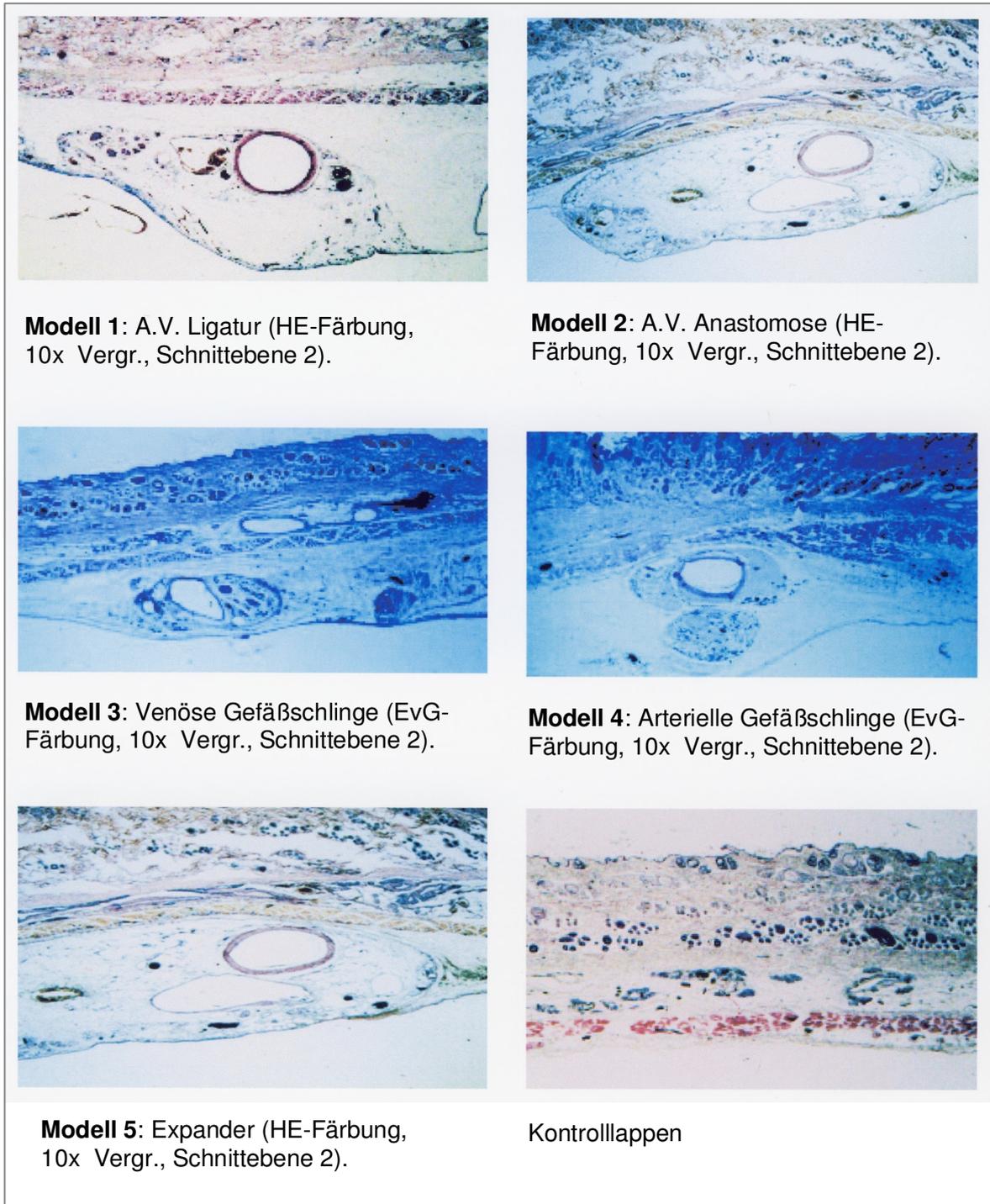


Abb. 37. Histologie der Gruppe 12-Tage von allen Modellen.

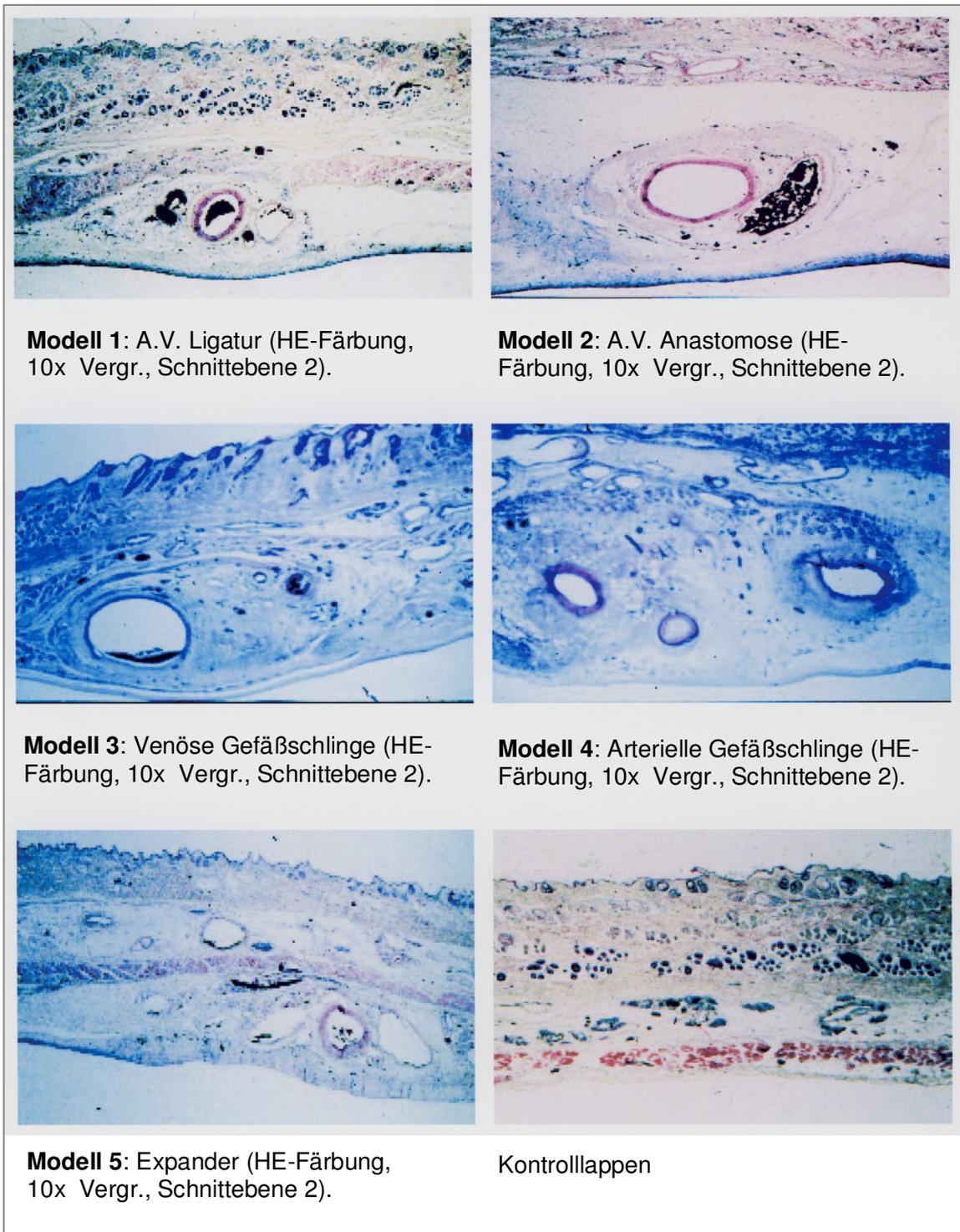


Abb. 38. Histologie der Gruppe 16-Tage von allen Modellen.

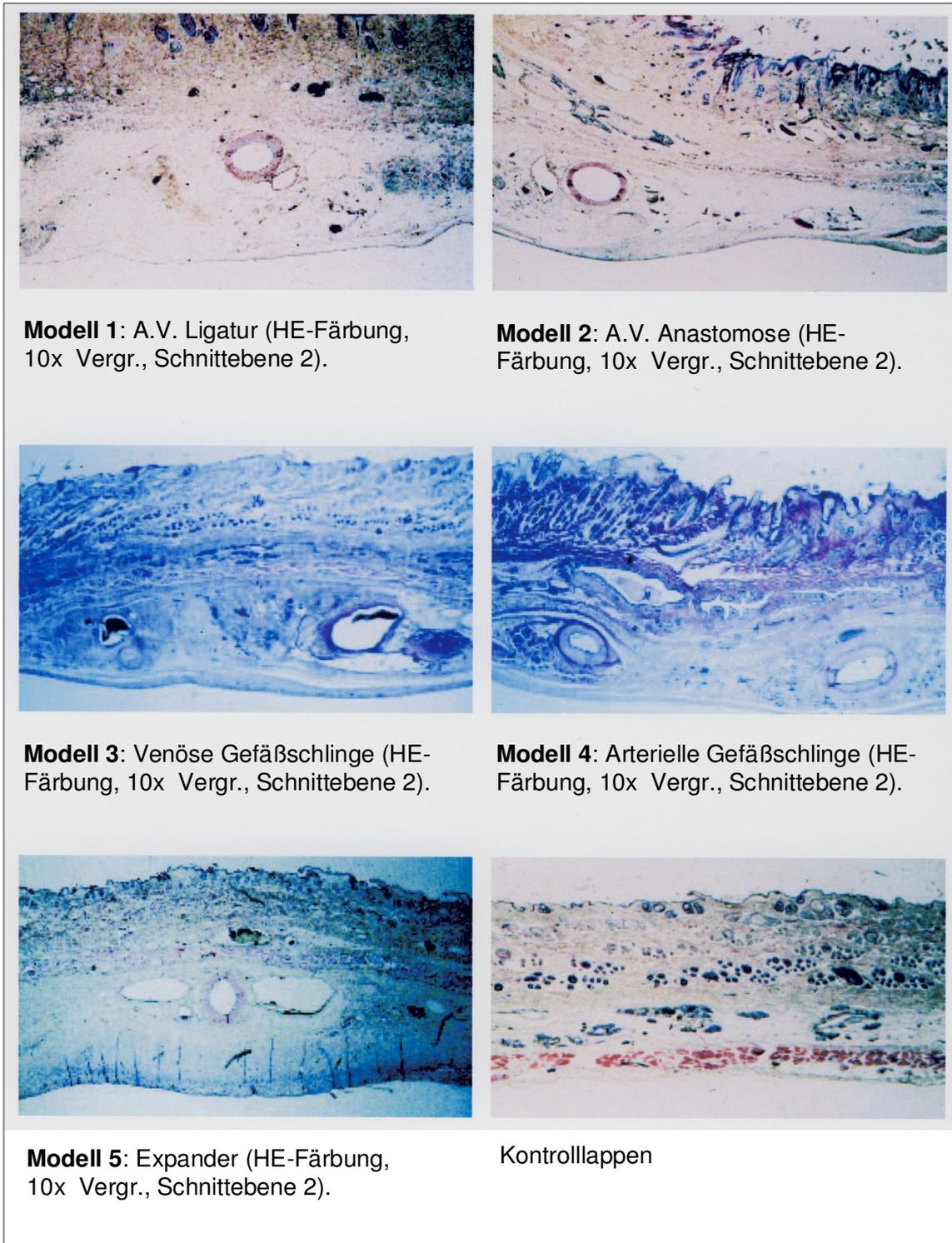


Abb. 39. Histologie der Gruppe 20-Tage von allen Modellen.

5.2. STUDIE II: Präfabrizierte Hautlappen in Kombination mit gezüchteten Knorpelzell-Biomaterialkonstrukten

Im Rahmen dieser Studie wurden insgesamt 8 Kaninchen operiert. Von den operierten Kaninchen starb ein Tier intraoperativ an einem Narkosezwischenfall und ein weiteres Tier starb postoperativ im Tierstall ohne erkennbare Ursache.

Insgesamt kamen 6 Kaninchen mit sechs Wochen Implantationszeit zur Auswertung. Bei diesen Kaninchen war der postoperative Verlauf problemlos.

5.2.1. In vitro Ergebnisse

5.2.1.1. Chondrozytengewinnung und –vitalität

Nach der Isolierung und Amplifikation in Monolayerkultur wurden die Zählung und Vitalitätsbestimmung der gezüchteten Chondrozyten mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und der Anfärbung mit FDA (Fluoreszin-Diazetat) und PI (Propidium Jodid) unter dem Lichtmikroskop durchgeführt. Vitale gezüchtete Knorpelzellen zeigten sich grün, wohingegen avitale Knorpelzellen rot erschienen.

Im Mittelwert wurden etwa 4×10^6 vitale gezüchtete Knorpelzellen pro Knorpelbiopsie nach 3 Passagen gewonnen. Nach der dritten Passage zeigten die Knorpelzellen das typische Muster der Dedifferenzierung, d. h. sie hatten nicht mehr den runden, knorpelspezifischen Phänotyp, sondern eher einen sternförmigen fibroblastenähnlichen Phänotyp.

5.2.1.2. Gezüchtete Knorpelzell-Biomaterialkonstrukte

Diese Zellen aus den Monolayerkulturen wurden konsequent auf 1 cm² große Proben von dem porösen Polycaprolactone in einer Konzentration von 20×10^6 Zellen/pro Kubikzentimeter des Konstruktes aufgebracht.

Die Vitalität durch die Anfärbungsmethode und die Adhäsion der Zellen an das Biomaterial zum Zeitpunkt der Implantation war gut und von nahezu 100% (*Abb. 40*).

Nach der Besiedlung standen 3 gezüchtete Knorpelzell-Konstrukte und ein Konstrukt ohne Zellen in vivo bereit zur Implantation.

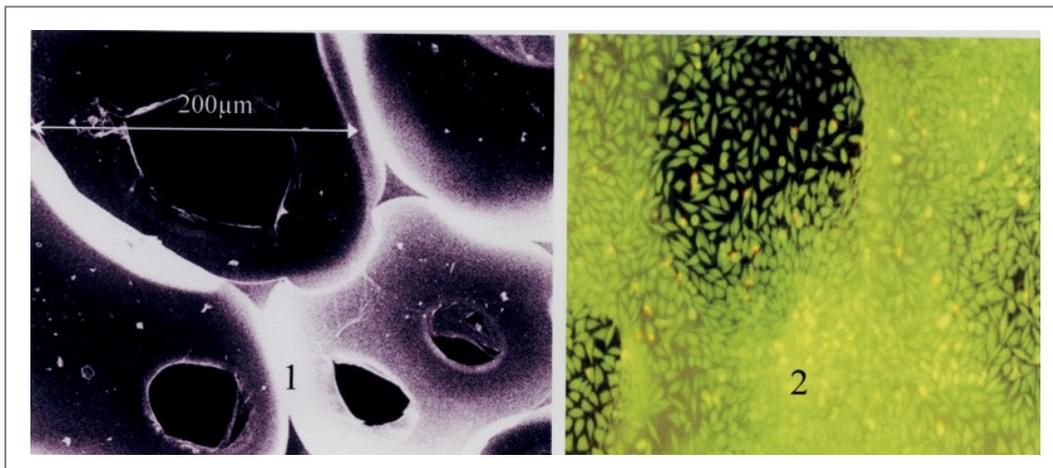


Abb. 40. Elektronenmikroskopie der Leitschiene (1) und Vitalfärbung (vitale Zelle: grün, tote Zellen: rot) nach der Besiedelung des Polycaprolactons (2).

5.2.2. In vivo Ergebnisse

5.2.2.1. Makroskopische Beurteilung und freie mikrochirurgische Transplantation

- Präfabrizierte Bauchhautlappen

Lappenaussehen: An allen Lappen in dieser Studie erschienen äußerlich keine Besonderheiten. Vitalität und Farbe des Lappens waren in der postoperativen Beobachtungszeit unauffällig. Das Haarwachstum auf dem ganzen Lappen, insbesondere an dunklen pigmentierten Hautstellen, war deutlich zu sehen. Die Wundheilung am Lappenrand war normal. Der im Lappen implantierte Gefäßstiel und Konstrukte konnten postoperativ im Lappen gut getastet werden.

Kapselneubildung: Ähnlich wie bei den präfabrizierten Hautlappen wurde an der Unterseite des Hautlappens eine glatte Kapselneubildung ausgebildet. Durch diese Kapselneubildung wurden der implantierte Gefäßstiel und die Konstrukte komplett mit dem fibrösen Gewebe umhüllt (Abb. 41).

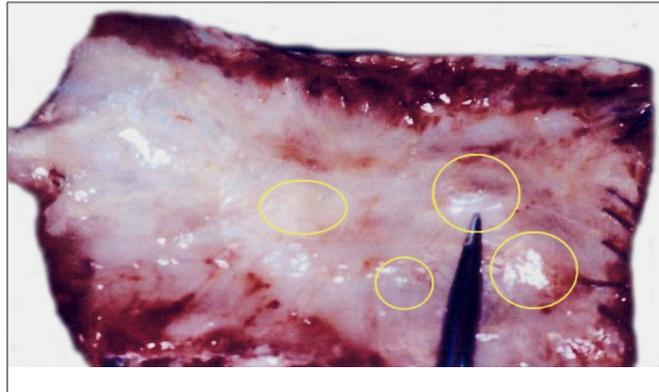


Abb. 41. Makroskopische Aufsicht an der Unterseite des präfabrizierten Lappens mit den Konstrukten (6 Wochen p.o.).

Serom und Infektion: Bei allen Lappen bildete sich lokal zwischen Lappen und Silikonfolie eine Serommenge von etwa 5 – 15 ml. Bei einem Versuchstier entwickelte sich postoperativ Eiter. Diese Komplikation wurde jedoch durch die Entnahme der Silikonfolie und eine Behandlung mit Antibiotikum (Baytril® 2,5%, 10 mg/kg) therapiert.

- Freie mikrochirurgische Lappentransplantation

Die freie Lappentransplantation unter Verwendung mikrochirurgischer Techniken wurde an 2 Kaninchen durchgeführt. Nach der Lappenaufhebung sowie einer klinisch freien Hautlappentransplantation wurden die Venen und Arterien des neuimplantierten Gefäßstiels mikrochirurgisch End-zu-End mit monofilem Nylon der Stärke 10/0 anastomosiert und der Hautlappen in situ zurückgenäht.

Die geringe venöse Kongestion des Lappens, die in den ersten zwei Tagen postoperativ entstand, bildete sich in den nächsten Tagen spontan zurück. Über den Beobachtungszeitraum von 2 Wochen zeigten diese Lappen ein unauffälliges postoperatives Aussehen mit normaler Farbe und Behaarung. Alle Lappenwundränder waren problemlos abgeheilt (*Abb. 42*).

- Gezüchtete Knorpelzellen-Konstrukte

Aus makroskopischer Sicht wurden die gezüchteten Knorpelzell-Konstrukte und Konstrukte ohne Zellen nach 6 Wochen Implantationszeit von der Kapselneubildung an der Unterseite des Lappens komplett umhüllt (*Abb. 41*). Durch diese Kapselneubildung

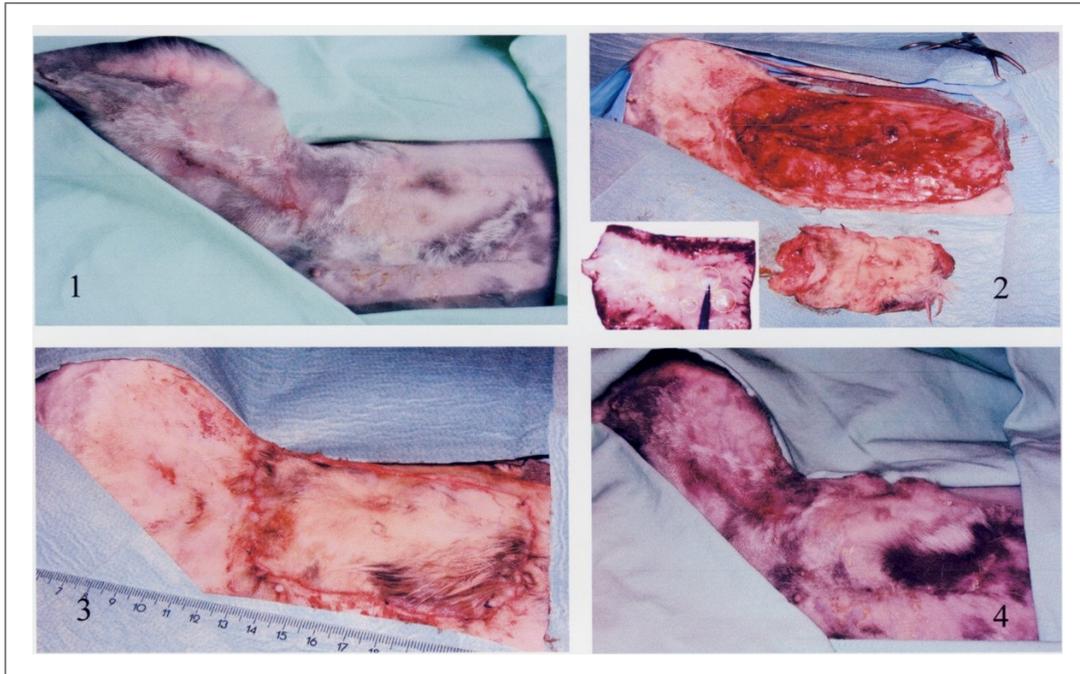


Abb. 42. Vitalität des präfabrizierten Bauchhautlappens in Kombination mit gezüchtetem Knorpelzell-Konstrukt (PL+KK) nach der freien mikrochirurgischen Transplantation. (1) PL +KK 6 Wochen p.o.; (2) Lappenaufhebung als ein freier Hautlappen; (3) Nach dem mikrochirurgischen Gefäßanschluss wurde der Hautlappen in situ zurückgenäht; (4) unauffällige Vitalität des Lappens 2 Wochen nach der freien Lappentransplantation.

waren die Konstrukte gut und stabil mit dem präfabrizierten Hautlappen verbunden. Es lagen hier keine Hinweise auf Entzündung oder Abstoßungsprozesse vor.

Bei der Explantation wurde die mechanische Stabilität der implantierten Konstrukte aufgrund des Mangels standardisierter Meßmethoden nur mit einer sterilen Pinzette getestet. Die gezüchteten Knorpelzell-Konstrukte waren mechanisch griffstabil mit einer festen Konsistenz, welche nativem Knorpel ähnelte. Die Konstrukte ohne Zellen hatten mechanisch die Stabilität von Bindegewebe.

5.2.2.2. Selektive mikroangiographie

Entsprechend den makroskopischen Beobachtungen zeigte die 6-wöchige selektive Mikroangiographie bei allen Lappen eine gute Perfusion im gesamten präfabrizierten Bauchhautlappen durch den Blutfluss aus dem implantierten arteriovenösen Gefäßstiel. Das neue Gefäßsystem im Lappen war identisch nahezu der 20-Tage-Gruppe in der Studie I. Die im präfabrizierten Hautlappen eingebrachten gezüchteten

Knorpelkonstrukte wurden mit einem feinen und dichten Gefäßnetz gut vaskularisiert (Abb. 43).

Mit Hilfe der Integralstrichplatte wurden die in Angiographien gewonnenen Werte ausgewertet und waren statistisch nahezu identisch mit der 20-Tage-Gruppe der Studie I (Siehe Tab. 7).

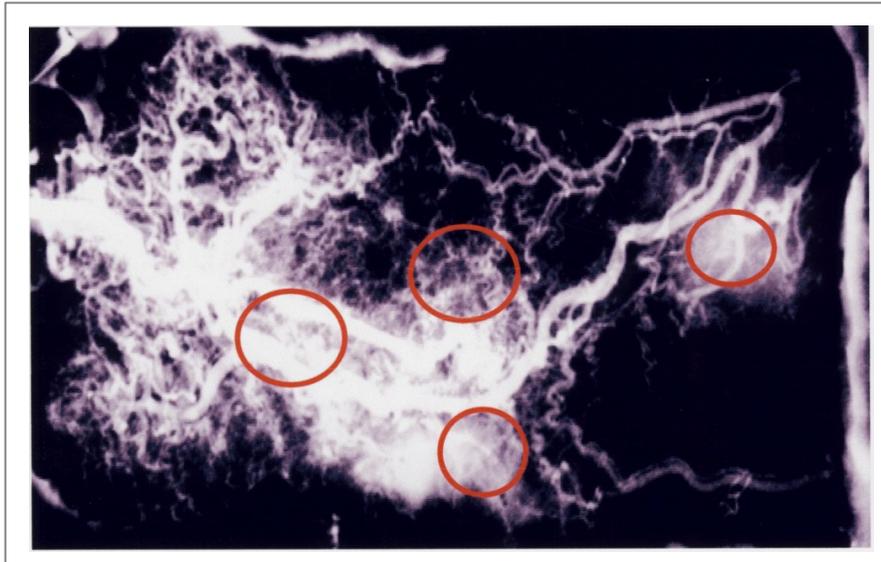


Abb. 43. Selektive Mikroangiographie des präfabrizierten Bauchhautlappens mit Konstrukten (6 Wochen p.o.).

Tabelle 7: Mittelwerte der Anzahl Mikropaque gefüllter Gefäße im präfabrizierten Lappen in Kombination mit gezüchteten Knorpelzell-Konstrukten.

Parameter Gruppe	Selektive Mikroangiographie			
	Anz. abs.	Anz. abs.-%	Sd.	Sd.-%
Präf. Lappen in Kombination mit T.E.	268	112	17	6,3

- Anz. abs. : Absolute Anzahl der Gefäße im Lappen.
- Anz. abs.-% : Absolute Prozente der Gefäße im Lappen
- Sd. : Standardabweichung
- Sd.-%. : Prozent der Standardabweichung
- T.E. : Tissue Engineering von Knorpelzellen

5.2.2.3. Histologische und immunhistochemische Untersuchungen

- *Histologische Untersuchungen*

Bei den HE-, und EvG-Färbungen erschienen alle Hautlappen morphologisch intakt und vital, mit unauffälligen Epidermis- und Unterhautstrukturen.

Nach 6 Wochen blieben die Konstrukte mechanisch in stabiler Form und wurden von der unter den Lappen gebildeten bindegewebigen Kapsel umhüllt. Durch diese Kapselneubildung wurden die gezüchteten Knorpelzell-Konstrukte und der Kontrollträger sowie der implantierte Gefäßstiel von den Lappen und der Kapselneubildung umschlossen. In den porösen Konstrukten zeigte die Histologie eine gute Neovaskularisierung in allen Präparaten mit zahlreichen unterschiedlichen Gefäßkalibern (*Abb. 44 und 45*).

Auf der mikroskopischen Ebene war bei allen Kontrollen (Konstrukte ohne Zellen) eine deutliche Infiltration von Fibroblasten ohne Hinweise auf Knorpelwachstum zu erkennen. Die unspezifische Zellinfiltration ergab jedoch keinen Hinweis auf eine spezifische Entzündungsreaktion auf das Material (*Abb. 44*).

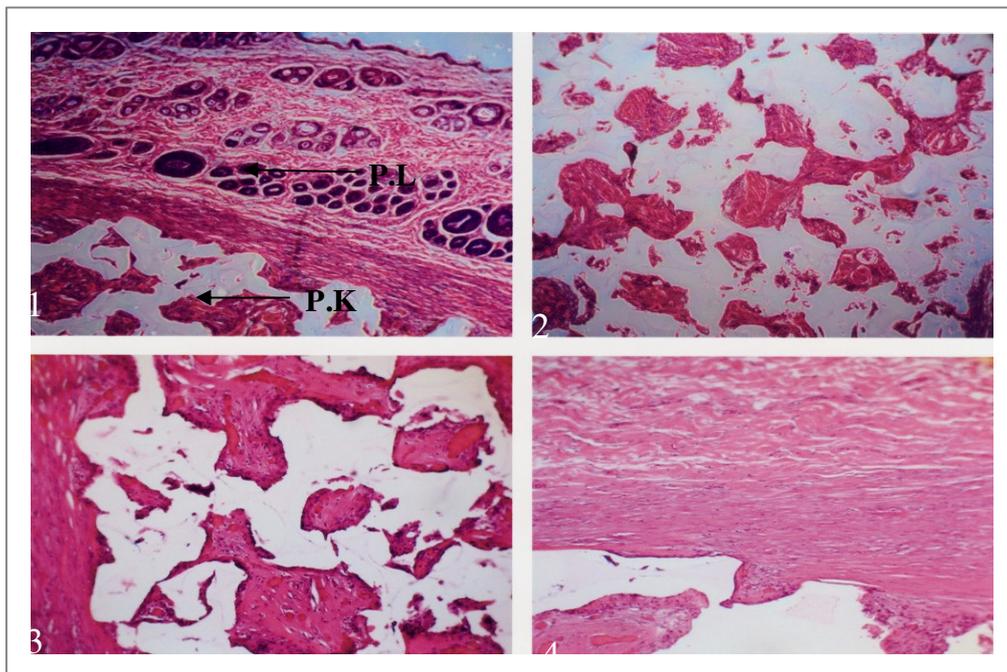


Abb. 44. Histologische Darstellung des Kontrollträgers (HE-Färbung, 5x, Schnittebene 4): (1) Präfabrizierter Lappen (P.L) und poröse Konstrukt (P.K) miteinander stabil verbunden; (2, 3, 4). Gute Neovaskularisierung und kräftige Infiltration von Fibroblasten im Konstrukt ohne Hinweise auf Knorpelwachstum bei allen Präparaten.

Im Gegensatz hierzu konnte die Entwicklung von knorpelähnlichen Geweben als ein Nachweis des Knorpelwachstums in den implantierten gezüchteten Knorpelzell-Konstrukten histologisch nachgewiesen werden. Diese knorpelähnlichen Zellen zeigten keine Hinweise auf Zellnekrose, Gewebeuntergang oder Entzündungsreaktionen aufgrund zytotoxischen Effekten des Biomaterials (Abb. 45).

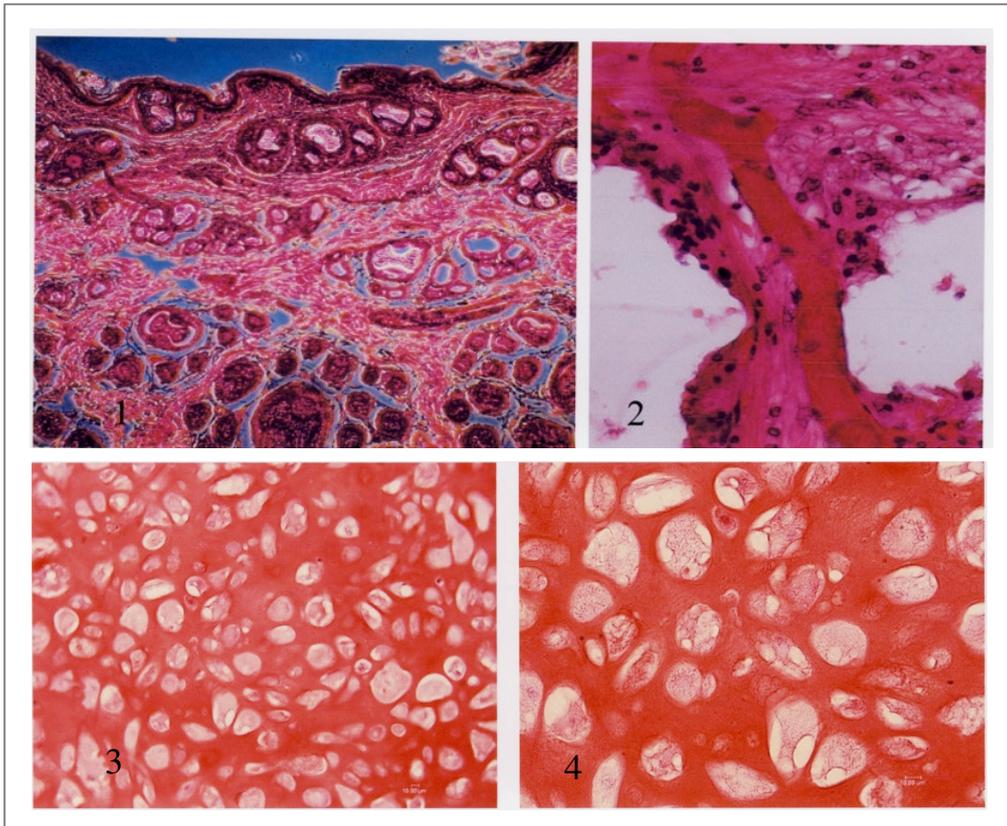


Abb. 45. Histologische Darstellung des gezüchteten Knorpelzell-Konstruktes (HE-Färbung, Schnittebene 3): (1) Präfabrizierter Lappen und poröses Konstrukt miteinander stabil verbunden (5x); (2) Gute Neovaskularisierung im Biokonstrukt aus Caprolactone (5x); (3,4) Knorpelähnliche Zellen zeigten sich als ein Hinweis auf das Knorpelwachstum in porösen Konstrukten 6 Wochen p.o (20x und 60x Vergrößerung).

- Histochemische Untersuchungen

Bei den gezüchteten Knorpelzell-Konstrukten konnten Zeichen der Bildung von Knorpelmatrix als eine Expression des Neoknorpelgewebes im Lappen nach 6 Wochen Implantationszeit durch die Alcian-Färbung nachgewiesen werden (Abb. 46). Bei den

Konstrukten ohne Zellen war die Bildung von Matrixproteinen (saurer Mukopolysaccharide) nicht nachweisbar.

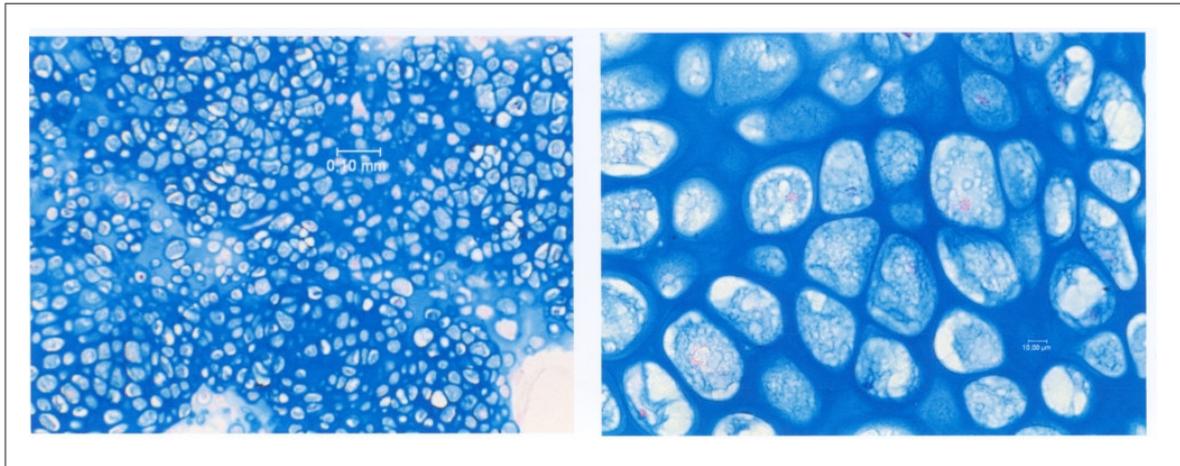


Abb. 46. Darstellung extrazellulärer Matrix (ECM) mit der Alcian-Färbung als Nachweis des Knorpelwachstums (blau) nach der Implantation von gezüchteten Knorpelzell-Konstrukten im präfabrizierten Bauchhautlappen (15x und 60x Vergrößerung).

6. DISKUSSION

6.1. Neovaskularisation präfabrizierter Hautlappen

Durch technische Fortschritte in der Plastischen Chirurgie, Traumatologie, Orthopädie, aber auch in der Onkologie hat sich die Indikation zur Rekonstruktion von kutanen Defekten gewandelt. Die Entwicklung der freien Gewebetransplantation und Verwendung mikrochirurgischer Technik repräsentiert einen historischen Meilenstein. Heute ist diese Behandlungsmethode in der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie etabliert und zu einer klinischen Standardmethode geworden. Freie axiale Gewebelappen können aus einer einzigen oder mehreren Gewebearten wie Haut, Muskel, Fettgewebe sowie Knorpel und Knochen bestehen.

Es liegt auf der Hand, dass freie Gewebelappen am menschlichen Körper anatomisch limitiert sind. Zudem sind sie für die Rekonstruktion filigraner Strukturen häufig zu dick bzw. zu plump und deshalb nicht ideal. Außerdem besteht nach der Lappenhebung häufig eine funktionell wie ästhetisch ungünstige Hebemorbidität.

Einer Weiterentwicklung in der rekonstruktiven Mikrochirurgie repräsentieren präfabrizierte Lappen in Kombination mit Implantation eines Gefäßstiels in ein randomisiert vaskularisiertes Gewebsareal.

Obwohl es viele experimentelle Untersuchungen über präfabrizierte Hautlappen gibt [46-56, 80-89], mangelt es jedoch an Untersuchungen über die Neovaskularisation nach Gefäßstielimplantation. Ein grundsätzliches Problem ist, nach welcher Zeit die Neovaskularisation im präfabrizierten Hautlappen nach Gefäßstielimplantation ausreicht, um den Lappen frei zu transplantieren. Weitere Fragen betreffen Form, Intensität der Neovaskularisation und potenziell unbekannte Einflussfaktoren.

Im Folgenden werden diese Grundfragen der Neovaskularisation diskutiert.

6.1.1. Zeitliche Entwicklung der Neovaskularisation in präfabrizierten Hautlappen

Neovaskularisation ist ein natürlicher Bestandteil des Wundheilungsprozesses. Obwohl ihr Mechanismus noch nicht vollständig verstanden wird und es weiterer Untersuchun-

gen bedarf, wurden bislang vorliegende Ergebnisse bereits in der rekonstruktiven Chirurgie bei der Lappenpräfabrikation angewandt [48, 95].

Die notwendige Zeitdauer der Neovaskularisation zur gestielten oder freien Lappen-
transplantation - ein zentrales Thema bei der Lappenherstellung durch Gefäßstielimplan-
tation - wird kontrovers diskutiert. Bis jetzt ist es nicht möglich aus verschiedenen expe-
rimentellen Untersuchungen, die im Folgenden diskutiert werden, einen Konsens abzu-
leiten.

Im Jahr 1983 führten Erk Y. und Mitarbeiter [48] experimentelle Arbeiten zur Herstellung
neovaskularisierter Lappen an Ratten, Hunden und Schweinen durch und fanden, dass
das Phänomen der Neovaskularisation nicht spezies-spezifisch ist. Sie stellten darüber
hinaus fest, dass der Prozess der Neovaskularisation sehr eng mit der Ankoppelung des
implantierten Gefäßträgers an das lokale Gefäßsystem und der Anwesenheit von vasku-
lären Proliferationsfaktoren zusammenhängt. Nach Erk [48] bedarf es 4 Wochen für eine
ausreichende Neovaskularisation im Muskellappen, bevor man den präfabrizierten Ge-
webslappen als einen freien mikrovaskulären Lappen transplantieren kann.

Im Jahr 1987 – 1989 publizierten Hirase Y. et al. experimentelle Arbeiten zur Neovasku-
larisation mit verschiedenen Gewebearten wie Haut-, Fett-, Muskel- und Knochengewe-
be [80-86]. Sie fanden bei ihren Untersuchungen, dass die neue Gefäßeinsprossung mit
der Verweilzeit an Ausmaß zunahm. Nach ihren Untersuchungen waren die Blutversor-
gung zwei Wochen nach der Gefäßstielimplantation für Haut-, Fett- und Muskellappen
und 3 Wochen für osteomyocutane Lappen in präfabrizierten Lappen ausreichend, um
sie frei transplantieren zu können.

Morisson W.A. et al. [128] führten 1990 experimentelle Untersuchungen an Kaninchen
zur Herstellung präfabrizierter Hautlappen mit mehreren unterschiedlichen Modellvarian-
ten des implantierten Gefäßstieles durch. Sie stellten fest, dass die Neovaskularisation
im Lappen deutlich verzögerter ablief. In ihren Experimenten überlebten die präfabrizier-
ten Hautlappen von 2 bis 4 Wochen nach der Gefäßstielimplantation nur teilweise. Eine
ausreichende Blutversorgung war erst nach 8 Wochen vorhanden. In den Beobach-
tungszeiträumen zwischen 8 und 12 Wochen fanden die Autoren, dass unabhängig von
den unterschiedlichen Gefäßstielvarianten kein wesentlicher Unterschied der Neo-
vaskularisation im Lappen beobachtet werden konnte.

Im Jahr 1993 kamen Ono H. und Mitarbeiter [140] durch ihre experimentelle Arbeit der
Neovaskularisation nach Gefäßstielimplantation mit Untersuchungszeiträumen von ein

bis 12 Wochen zu dem Ergebnis, dass mindestens 6 Wochen bis zur ausreichenden Blutversorgung in präfabrizierten Hautlappen notwendig sind.

Im Jahr 2000 machten Atabay A. und Mitarbeiter [7] an Ratten Experimente zur Herstellung von kombinierten präfabrizierten Haut-Muskel-Faszien-Knorpellappen mittels Implantation des Gefäßträgers aus A.V. epigastrica superficialis inferior (S.I.E.) unter dem Bauchhautlappen. Durch makroskopische, mikroangiographische und histologische Untersuchungen stellten diese Autoren fest, dass 6 Wochen die notwendige Zeit der Lappenpräfabrikation zum freien Lappentransfer gewährleisten.

Demgegenüber berichteten Macleod und Mitarbeiter (2003) über eine experimentelle dreidimensionale Hautlappenpräfabrikation unter Verwendung eines synthetischen Permacol-Materials als Stützgerüst am Modell der Ratten. Demnach war 2 Wochen nach der Gefäßstielimplantation der gesamte dreidimensionale Hautlappen bereits gut vaskularisiert [124]. Pribaz und Mitarbeiter (1999) stellten fest, dass im experimentellen Kaninchenmodell alle präfabrizierten Hautlappen 2 Wochen nach der Präfabrizierung problemlos via neu implantiertem Gefäßstiel überleben konnten.

Aufgrund dieser unterschiedlichen Meinungen über die notwendige Zeitdauer der Neovaskularisation im präfabrizierten Gewebslappen halten wir weiterführende experimentelle Untersuchungen für erforderlich.

In unserer Studie wurden Kaninchen als Versuchstiere ausgewählt, weil sie aufgrund der anatomischen Ähnlichkeit der Haut und den guten operativen Möglichkeiten zum Design großer Hautlappen, entsprechend den klinischen Erfordernissen sehr geeignet sind.

Auf die Unterseite eines großen Bauchhautlappens (15 x 8 cm) wurde der zuvor skelettierte Gefäßstiel aus A. und V. femoralis und A. und V. saphena der ipsilateralen Seite implantiert. Eine Silikonfolie der Dimension von 15 cm x 8 cm x 0,25 mm (bzw. ein Expander mit maximalem Volumen von 250 ml beim Modell 5) wurde zur Vermeidung einer Gefäßeinsprossung aus dem Wundgrund auf der Bauchwandfaszie fixiert. Die Vitalität und Neovaskularisation der präfabrizierten Hautlappen wurde durch Makroskopie, Szintigraphie, selektive Mikroangiographie und Histologie untersucht.

Mit den makroskopischen Untersuchungen konnte bei allen Versuchstieren eine unauffällige postoperative Lappenvitalität mit normalem Haarwachstum und Aussehen nachgewiesen werden. Zur freien oder gestielten Lappentransplantation wurde an 6 Versuchstieren der Bauchhautlappen der 20-Tage-Gruppe in gleicher Dimension und Lap-

pendesign unter Erhalt des neu implantierten Gefäßstiels umschnitten. Bei diesen gehobenen Lappen wurde die Lappenvitalität im Hinblick auf Farbe, Aussehen, Behaarung und Wundrandheilung über einen Beobachtungszeitraum von 2 Wochen beurteilt. Makroskopischen Ergebnisse zeigten, dass die Vitalität und Wundheilung dieser Inselappen anderen physiologischen Hautbereichen des Körpers entsprachen. Makroskopisch war von einer sicheren Lappentransplantation, gestielt oder mikrovaskulär, auszugehen.

Bei den szintigraphischen Untersuchungen beschränkte sich die Verteilung des Radiopharmakons in der 4-Tage-Gruppe im wesentlichen auf den implantierten Gefäßstiel. Die Verteilung der Aktivität nahm deutlich mit der Verweilzeit der Gefäßstielimplantation zu. Zwanzig Tage postoperativ war der Lappen vollständig perfundiert sowie der Nachweis neuer Gefäßaussprossungen und ihrer Verbindungen mit dem bereits im Lappen vorhandenen Gefäßsystem möglich.

Die selektive Mikroangiographie repräsentiert zweifelsohne den entscheidenden Parameter zur Untersuchung der Richtung, Ausdehnung, Geschwindigkeit und Form der Neovaskularisation in den präfabrizierten Hautlappen nach der Gefäßstielimplantation. Mittels dieser Technik konnten neue Gefäßaussprossungen aus dem implantierten Gefäßstiel nachgewiesen werden. Diese Aussprossungen nahmen in Ausdehnung und Dichte mit zunehmender Verweilzeit des implantierten Gefäßstieles deutlich zu. Im Hinblick auf den Blutfluss im Gefäßstiel war die Neovaskularisation im Hautlappen deutlich in Modellen mit maximalem Blutfluss mittels arterio-venöser Shuntbildung (vom Modell 2 bis Modell 5), insbesondere in Kombination mit Lappenexpansion (Modell 5) gesteigert im Vergleich mit dem minimalen Blutfluss durch die endständige Ligatur (Modell 1) (*siehe Tab. 4 und Abb. 29-34*).

Mit einem Prozentwert der kontrastmittelperfundierten Gefäße von 98,7% beim Modell 1; 108,6% beim Modell 2; 105,6% beim Modell 3; 108,8% beim Modell 4; und 113,6% beim Modell 5 wurde der präfabrizierte Bauchhautlappen der 20-Tage-Gruppe in allen Modellen nahezu physiologisch (100%) perfundiert. Folglich kann man aufgrund der mikroangiographischen Untersuchung davon ausgehen, dass zu diesem Zeitpunkt die Lappenblutperfusion in allen Modellen ein physiologisches Ausmaß erreicht hatte. Mikroangiographisch war die Unterscheidung zwischen neu gebildeten und bereits im Lappen vorhandenen Gefäßen methodisch nicht möglich.

Mittels den histologischen Befunden konnten im Wesentlichen die makroskopischen, szintigraphischen und mikroangiographischen Ergebnisse bestätigt werden. In allen untersuchten Gruppen erschien die Histologie physiologisch und vital. Durch die Verteilung vom Mikropaque aus dem implantierten Gefäßstiel ins gesamte Gefäßnetz des Hautlappens konnte eine ausreichende Neovaskularisation nach 20 Tagen histologisch festgestellt werden.

Die Ergebnisse dieser Studie beweisen also, dass nach 20 Tagen der Gefäßstielimplantation der präfabrizierte Hautlappen unabhängig von Gefäßstielvarianten frei oder gestielt transplantiert werden kann.

Unsere Ergebnisse decken sich weitgehend mit den Veröffentlichungen von Itoh Y. [99] im Jahre 1992, der Untersuchungen zur Neovaskularisation unter Verwendung von Silikonfolie bei der Ratte durchführte. Unter Verwendung einer auf der Bauchwand fixierten Silikonfolie der Größe 40 x 25 mm implantierte er A. und V. femoralis und saphena magna (endständige Ligatur) auf die Unterseite eines ipsilateralen Bauchhautlappens. Er stellte fest, dass die Neovaskularisation im präfabrizierten Hautlappen 2 bis 3 Wochen nach Gefäßstielimplantation meistens stabil und sicher war. Nach Itoh begann die Neovaskularisation bereits in der ersten Woche. Mit zunehmender Verweilzeit des implantierten Gefäßstieles verstärkte sich die Neovaskularisation und erreichte nach 2 - 4 Wochen den Spitzenwert. Nach 4 Wochen nahm die Zahl der Gefäße im Lappen wieder ab und war deshalb zwischenzeitlich geringer ausgeprägt als in physiologisch perfundierten Lappen.

Unsere Ergebnisse wurden ebenfalls durch experimentelle Untersuchungen von Takato T. et al. [181-183] bestätigt. Demnach nahm die Neovaskularisation im präfabrizierten Lappen nach Gefäßstielimplantation beim Kaninchen sehr schnell zu. Drei Wochen p.o. erschien als der optimale Zeitpunkt zur Neovaskularisation in präfabrizierten Gewebslappen, um diese als freie Lappen transplantieren zu können.

Aufgrund der sehr unterschiedlichen Zeitdauer der Neovaskularisation in präfabrizierten Hautlappen in verschiedenen experimentellen Studien stellte sich die Frage, worin die Ursachen hierfür begründet sind.

Die Neovaskularisation in präfabrizierten Hautlappen wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Die unterschiedliche Zeitdauer der Neovaskularisation kann nach unseren

Experimenten und den Ergebnissen von Morisson (1990), Ono (1993) und Atabey (2000) von folgenden Ursachen abhängen:

Erste Ursache des Unterschieds ist möglicherweise die Insertion der Silikonfolie, die unter den präfabrizierten Lappen auf die Bauchwandfaszie genäht wurde. Aufgrund der Fremdkörperreaktion führt Silikonfolie zu einer lokalen Entzündungsreaktion. Dieser Entzündungsprozess kann die Dilatation lokaler Gefäße bedingen und das Wachstum neuer Gefäße stimulieren. Zusätzlich kann die Kapselneubildung um die Silikonfolie durch ihr reiches Blutsystem auch indirekt die Neovaskularisation im Lappen verstärken. Zweitens unterscheidet sich unser Untersuchungsaufbau im Vergleich zu Morisson W.A. et al. [128] durch den im Gewebelappen enthaltenen Panniculus carnosus. Hypothesen über die Rolle des Panniculus carnosus bei der Neovaskularisation wurden von verschiedenen Autoren aufgestellt [182, 183, 204]. Viele dieser Autoren meinen, dass der Panniculus carnosus durch sein reiches Gefäßsystem einen positiven Einfluss auf die Gefäßneubildung ausübt.

Der dritte wichtige Unterschied besteht darin, dass Morisson und Mitarbeiter die Hautlappen am Oberschenkel, in einem sehr mobilen Bereich wählten, so dass die Neovaskularisation im Lappen eventuell hierdurch verzögert werden konnte.

In den experimentellen Untersuchungsarbeiten von Hirase Y. und Mitarbeiter (1987-1989) sowie Macleod und Mitarbeiter (2003) betrug die Neovaskularisationszeit um 2 Wochen. Die mögliche Ursache hierfür ist unserer Meinung nach in der kleinen Dimension der untersuchten präfabrizierten Gewebslappen (von 2 x 3 cm bis 4 x 6 cm) begründet. Die Zeitdauer zur ausreichenden Neovaskularisation im Gewebslappen konnte dadurch deutlich verkürzt werden.

6.1.2. Formen der Neovaskularisation in präfabrizierten Lappen

Ein wichtiges Kriterium unserer Untersuchungen sind die Art und Ausdehnung der Neovaskularisation im präfabrizierten Hautlappen. Durch die angiographischen Darstellungen in der vorliegenden Untersuchungsarbeit können wir drei unterschiedliche Formen unterscheiden.

Die erste Form der Neovaskularisation ist die Aussprossung neuer Gefäße aus dem implantierten Gefäßstiel. Diese Form konnte relativ früh nach Silikon- und Gefäßstielimplantation beobachtet werden und nahm sehr schnell bis zum Ablauf von 3 Wochen zu.

Die zweite Form der Neovaskularisation sind das Wachstum und die Proliferation der bereits im Lappen existierenden Gefäße als Reaktion auf die operative Lappenbildung sowie auf die Ischämie im Lappen (durch dreiseitige Lappenumschneidung).

Die dritte Form der Neovaskularisation besteht in der Verbindung zwischen neugebildeten Gefäßen aus dem implantierten Gefäßstiel und dem bereits im Lappen vorhandenen Gefäßsystem. Diese Form wurde in der ersten bis zur dritten Woche nach Gefäßstielimplantation beobachtet.

Ähnliche Ergebnisse veröffentlichten Falco N.A. et al. [55] und Itoh Y. [99] über die Neovaskularisation in präfabrizierten Lappen durch arterio-venöse Gefäßstielimplantation. Im Gegensatz zu unseren Beobachtungen beschrieb Shen T.Y. [165] die Neovaskularisation in 2 Formen. Die erste Form war das Wachstum der neuen, direkt aus dem Gefäßstiel ausgehenden Gefäße. Die zweite Form war das Wachstum und die Proliferation der neuen Gefäße. Der Unterschied zwischen Shen T.Y. und unseren Beobachtungen ist möglicherweise in der Verwendung der Silikonfolie begründet.

6.1.3. Einflussfaktoren auf den Neovaskularisationsprozess in präfabrizierten Hautlappen

- Blutströmung

Eine wichtige Rolle für den Prozess der Gefäßneubildung bzw. Kapillareinsprossung bei der Herstellung von präfabrizierten Hautlappen spielt die Blutströmung bzw. das im implantierten Gefäßstiel an einem Ort der potentiellen Angiogenese lokalisierte Blutvolumen.

Die fortschreitende Neovaskularisation im präfabrizierten Gewebslappen in Abhängigkeit vom Blutfluss des arterio-venösen Gefäßstiels wurde von vielen Autoren beschrieben [53, 54, 61, 73, 112, 184]. Nach Ansicht dieser Verfasser ist der verstärkte arterio-venöse Blutfluss im implantierten Gefäßstiel ein wichtiger Faktor für die Geschwindigkeit der Neovaskularisation in präfabrizierten Hautlappen.

Diese schnellere Geschwindigkeit und Ausdehnung der Neovaskularisation in präfabrizierten Gewebslappen mit maximalem Blutfluss im implantierten Gefäßstiel wurde auch von Zhou Z.Y. und Mitarbeiter [209] beschrieben. Sie berichteten am Modell der Ratte über die Neovaskularisation eines Muskelhautlappens durch die Implantation eines aus den Schwanzgefäßen hergestellten arterio-venösen Shunts. Sie fanden, dass sich die

Neovaskularisation im präfabrizierten Lappen mit endständiger arterio-venöser Shuntneubildung (maximaler Blutfluss) deutlich besser und schneller als bei endständiger arterio-venöser Ligatur (minimaler Blutfluss) entwickelt. Sie unterstrichen, dass der maximale Blutfluss des implantierten Gefäßstieles ein wichtiger Bestandteil zur erfolgreichen Neovaskularisation im präfabrizierten Gewebslappen darstellt.

Diese Ergebnisse können im wesentlichen durch unsere experimentellen Untersuchungsarbeiten bestätigt werden.

In der vorliegenden Studie wurden 5 verschiedene Modellvarianten des implantierten Gefäßstiels mit minimalem Blutfluss durch endständige A.V. Ligatur (beim Modell 1) und maximalem Blutfluss durch mikrovaskuläre A.V. Anastomosen (vom Modell 2 bis Modell 5) getestet. In den untersuchten Beobachtungszeiträumen von 8, 12, 16 und 20 Tagen waren Ausdehnung, Form und Geschwindigkeit der Neovaskularisation sowie die quantitative Anzahl der vom Mikropaque im Lappen perfundierten Gefäße im Modell 2 bis Modell 5 (maximaler Blutfluss) deutlich schneller und ausgeprägter als im Modell 1 (minimaler Blutfluss nur über die Vasa vasorum).

Die Auswertung der vorliegenden Studie zeigt, dass das Neovaskularisationspotenzial im Modell mit maximalem A.V. Blutfluß deutlich größer als bei minimalem A.V. Blutfluß ist. Bei der Verwendung der arteriovenösen Shuntbildung ist die cardiale Belastung mit potentiellen Symptomen der Arrhythmie und Kreislaufinsuffizienz kritisch zu berücksichtigen. Nach der Meinung von Inada Y. et al. [97] können cardiale Probleme entstehen, wenn 20 - 50% des Herzvolumens durch den arterio-venösen Shunt fließen. Bei Patienten ohne zusätzliche Erkrankungen stellte cardiale Arrhythmie und Kreislaufinsuffizienz bei einem temporären arterio-venösen Shunt jedoch kein wesentliches Risiko dar. In der klinischen Routine repräsentiert die temporäre arterio-venöse Shuntbildung zur Herstellung des maximalen Blutflusses in einem implantierten Gefäßstiel, unsere Meinung nach, eine erfolgreiche und einfache Technik zur Optimierung einer schnelleren und sichereren Neovaskularisation in präfabrizierten Hautlappen. Zur Vermeidung potentieller langfristiger Komplikationen sollte die arterio-venöse Gefäßschlinge nach der Lappen- transplantation jedoch ligiert werden.

- Blutiger Kontakt zwischen Gefäßstielimplantation und Lappen

Der direkte blutige Kontakt zwischen implantiertem Gefäßstiel und Hautlappen ist zweifelsohne eine wichtige Voraussetzung für die Neovaskularisation in präfabrizierten Hautlappen.

Aus unseren Beobachtungen folgern wir, dass der Gefäßneubildungsreiz nicht nur vom Bauchhautlappen (Wirtsgewebe) ausgeht, sondern auch vom implantierten Gefäßstiel selbst. Der Kontakt des Trägergefäßes mit dem Wirtsgewebe scheint auf jeden Fall notwendig zu sein.

Dieser Standpunkt wird von vielen Autoren bestätigt [17, 34, 46]. Khouri R.K. et al. [108, 109] stellten fest, dass sich die Neovaskularisation in präfabrizierten Gewebelappen nach Trägergefäßimplantation schneller entwickelte, wenn der Oberflächenkontakt zwischen Lappen und Gefäßträger vergrößert wurde.

- Die Rolle des periadventitiellen Gewebes

Die wichtige Rolle des den implantierten Gefäßstiel umgebenden periadventitiellen Gewebes bei der Neovaskularisation wurde bereits von vielen Autoren beschrieben [193, 204, 207]. Nach Valauri F.A. et al. [193] traten im implantierten Gefäßstiel häufig Thrombosen auf, wenn das perivaskuläre Gewebe des implantierten Gefäßstieles vollständig abpräpariert wurde. Wilson Y.T. et al. [204] kommen in ihren Untersuchungen am Kaninchen über die Anwendung von Veneninterponaten als Gefäßstiel in präfabrizierten Hautlappen zu dem Ergebnis, dass das perivaskuläre Gewebe ein wichtiger Faktor zur Sicherheit der Durchgängigkeit der Anastomose und der Neovaskularisation im Lappen darstellt. Yap-Legaspi E.C. et al. [207] betonten in ihren Untersuchungen ebenso, dass bei der Herstellung präfabrizierter Hautlappen durch Gefäßstielimplantation das perivaskuläre Gewebe um den Gefäßstiel unbedingt geschützt werden muss, um die Neovaskularisation im Lappen sicherer zu gestalten.

Auch nach unserer Meinung ist das perivaskuläre Gewebe am Gefäßstiel, besonders bei der Anwendung von Silikonfolie oder Expander ein notwendiger Bestandteil, um Neovaskularisation und Durchgängigkeit der Anastomose im Lappen erfolgreich zu gewährleisten.

- Die Rolle angiogenetischer Faktoren

Ein wichtiger Punkt bei der Herstellung präfabrizierter Hautlappen ist die Rolle der angiogenetischen Faktoren. Nach Beyer M. et al. [17] können angiogenetische Faktoren, wie z. B. das allgemeine chemische und physikalische Milieu, die Umgebungstemperatur, die Konsistenz des umgebenden Mediums, mechanische Einwirkungen sowie Stoffwechsel und Zirkulation maßgeblichen Einfluss auf die Gefäßneubildung haben. Aus den Ergebnissen unserer Untersuchung können wir hierzu jedoch keine Aussage ableiten.

- Die Rolle der Ischämie

Obwohl der genaue Wirkungsmechanismus der Ischämie im Rahmen der Neovaskularisation in präfabrizierten Hautlappen noch nicht vollständig aufgeklärt ist, wird der begünstigende Einfluss der Ischämie von vielen Autoren postuliert.

Zahlreiche Verfasser [45, 46, 48, 55, 116, 128] bestätigten in ihren Publikationen die bedeutende Rolle von Ischämie und Entzündung zur Neovaskularisation in Lappen. Nach diesen Autoren verstärkt die Ischämie deutlich den Prozess der Neoangiogenese. Dementsprechend stellten Kostakoglu N. und Mitarbeiter [113] fest, dass Ischämie einen wichtigen Einfluss auf die Neovaskularisation in präfabrizierten Lappen ausübt, indem die Verminderung des Blutflusses im Lappen eine vermehrte Proliferation von neuen Gefäßen induziert.

Im Jahre 1993 führten Im M.J. und Mitarbeiter [95] an Ratten Untersuchungen über den Einfluss der Innervation sowie freier Sauerstoffradikale in Relation mit Ischämie in Lappen zur Neovaskularisation durch. Sie fanden, dass Neovaskularisation als ein Teil des Wundheilungsprozesses anzusehen ist. Unter der Einwirkung von Wachstums- und Angiogenesefaktoren, die aus Entzündungszellen, wie z. B. Lymphozyten, Neutrophilen und Makrophagen stammen, wird der Neovaskularisationsprozess initiiert. Dabei sprossen Endothelzellen zur Angiogenese aus präexistierenden Kapillaren aus. Die Autoren betonten, dass die Einwanderung von kapillären Endothelzellen aus den Gefäßwänden ein Schlüsselereignis der Neovaskularisation *in vivo* darstellt.

Dieser Standpunkt wurde auch von Morisson W.A. und Mitarbeiter [128] bestätigt. Diese Autoren meinten, dass Ischämie und Entzündungsreaktion die Neovaskularisation in Lappen stimulieren. Makrophagen, als wichtiger Faktor bei Entzündungs- und Wundheilungsprozessen, sezernieren Angiogenesefaktoren zur Neovaskularisation in Lappen.

Weitere Untersuchungen bezüglich der Rolle der Ischämie zur Neovaskularisation und des Mechanismus von angiogenetischen Prozessen sind nach unserer Meinung von großer Bedeutung.

6.1.4. Vorgänge der Gefäßneubildung

Nach Folgmann (1985) erfolgt die Bildung neuer Gefäße immer im gleichbleibenden Schema. Auf einen angiogenen Stimulus hin setzen die kapillären Endothelzellen einen plasminogenen Aktivator und Kollagenase frei. Durch die konsekutive Lyse der Basalmembran der Gefäße migrieren die Endothelzellen in den perivaskulären Raum. In diesen Endothelzellen beginnt eine Mitose von DNA, woraufhin sich die kapillären Knospen zu echten Gefäßen verlängern. Gleichzeitig findet die Lumenbildung statt. Die kapillären Aussprossungen zweigen sich an der Spitze auf und die Äste anastomosieren miteinander. Nach der Bildung dieser Loops setzt der Blutfluss ein und es wird eine neue Basalmembran synthetisiert.

Mastzellen können die Migration der Endothelzellen beschleunigen, indem sie die Matrix (vermutlich mittels langsamer Freisetzung von Heparin) so präparieren, dass die kapillären Aussprossungen leichter durchdringen.

Wenn der angiogene Stimulus sistiert, bilden sich die Kapillaren zurück. Die Mitochondrien in den Endothelzellen schwellen an, Blutplättchen haften sich an das Endothel und es kommt zu einer vaskulären Stase, woraufhin die Endothelzellen degenerieren und von eingewanderten Makrophagen entsorgt werden.

6.1.5. Quantifizierung der Neovaskularisation im Lappen

Die entscheidende Voraussetzung für eine erfolgreiche freie Lappentransplantation nach der Präfabrikation ist die ausreichende Neovaskularisation im Lappen durch die vollständige Blutperfusion aus dem neu implantierten Gefäßstiel. Die ausreichende Neovaskularisation in präfabrizierten Lappen kann im Prinzip angenommen werden, wenn das gesamte Gefäßnetz identisch in Form und Anzahl zum physiologischen Kontrolllappen perfundiert wird.

Obwohl zahlreiche experimentelle Untersuchungen mit nicht quantifizierten Angiogrammen sowie zahlreiche erfolgreiche klinische Anwendungen von präfabrizierten Hautlappen bekannt sind, wurde bislang jedoch über keine standardisierte Methode zur Quantifizierung der Neovaskularisation bzw. zur wissenschaftlichen Auszählung der perfundier-

ten Gefäße in präfabrizierten Hautlappen berichtet. Bei der Auswertung von über 250 englisch- und deutschsprachigen Publikationen fand sich keine Arbeit über die Methode bzw. die Ergebnisse der quantitativen Auszählung der Neovaskularisation aus angiographischen Aufnahmen.

Die Quantifizierung der in Lappen vom Mikropaque perfundierten Gefäßbäume, die aus Gefäßneuaussprossungen, dem bereits vorhandenen Gefäßsystem und ihren zahlreichen Gefäßanschlüssen bestehen, stellt eine besondere Herausforderung dar. In der vorliegenden Studie wurde erstmalig eine neue quantitative Auszählungsmethode zur Quantifizierung der Neoangiogenese mittels Angiogrammen entwickelt. Die quantitative Auswertung der in Hautlappen von Kontrastmittel gefüllten Gefäße erfolgte mit Hilfe einer standardisierten Integralstrichplatte mit gleichmäßigen 25 Strichlinien entsprechend der 15 cm Lappenlänge unter Verwendung einer Lupenbrille mit zweifacher Vergrößerung (*Abb. 19A*). Die Zählung der gesamten Anzahl von gekreuzten Markierungen zwischen der Strichlinie und den im Lappen vom Mikropaque perfundierten Gefäßen wurde sorgfältig bei jedem untersuchten Angiogramm durchgeführt. Mit dieser Auszählungsmethode ließ sich die Anzahl der neu gebildeten Gefäße in präfabrizierten Hautlappen und Kontrolllappen exakt bestimmen.

Nach dieser Methode könnten theoretisch modifizierte Integralstrichplatten in jeder Größe und Erfordernis der jeweils untersuchten Lappendimension hergestellt werden. Aufgrund der gleichen Dimension von präfabrizierten Hautlappen und Kontrolllappen bleibt bei jeder modifizierten Größe oder Strecke der Integralstrichplatte nach wie vor das vergleichbare Verhältnis im Hinblick auf das Ergebnis bestehen.

Die quantitative Auswertung der Angiogramme in der vorliegenden Studie konnte bestätigen, dass bei Verwendung der Silikonfolie der Zeitraum von 20 Tagen nach der Gefäßstielimplantation "die minimale Zeitdauer" für eine ausreichende Neovaskularisation in Hautlappen darstellt. Danach kann eine gestielte oder mikrovaskuläre Lappentransplantation unabhängig von der verwendeten Gefäßstielvariante durchgeführt werden.

6.2. Verwendungsmöglichkeit von Gefäßstielvarianten zur Lappenherstellung

Nach der experimentell vorliegenden Studie stehen verschiedene Gefäßstielvarianten zur Hautlappenpräfabrikation zur Verfügung. Bei Auswahl des Gefäßstiels sollten prinzi-

piell neben der ausreichenden Neovaskularisation im Hautlappen auch stets die Zeitdauer und Hebedefektmorbidität berücksichtigt werden.

Im Folgenden werden die klinischen Verwendungsmöglichkeiten der jeweilig implantierten Gefäßstieltypen diskutiert.

6.2.1. Arterio-venöser Gefäßstiel mit endständiger Ligatur

Die Verwendung arterio-venöser Gefäßstiele mit endständiger Ligatur wurde in zahlreichen experimentellen Untersuchungen und klinischen Anwendungen publiziert [1, 14, 108, 137, 151].

Ein Vorteil der Verwendung dieses Gefäßstieltyps ist zunächst die leichte Präparation, sowie die schnelle und sehr einfache Gefäßstielhebung. Potentielle klinische Applikationsformen sind z. B. A. und V. temporalis, A. und V. radialis, A. und V. cubitalis, A. und V. epigastrica inferior, A. und V. circumflexa iliaca superficialis, A. und V. circumflexa femoralis lateralis, A. und V. tibialis anterior, A. und V. dorsalis pedis u.a. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass bei der ersten Operation eine mikrovaskuläre Anastomose nicht notwendig ist.

Der wesentliche Nachteil dieses Gefäßstieltyps stellt die möglicherweise langsamere und unsichere Neovaskularisation im präfabrizierten Hautlappen dar. Dementsprechend ist deshalb bei der klinischen Anwendung die Verlängerung der Präfabrikationszeitdauer mit konsekutiv erheblichem Personalaufwand, Behandlungskosten und Belastung für Patienten zu berücksichtigen.

Darüber hinaus wird bei diesem Gefäßstieltyp das vermehrte Auftreten einer postoperativen venösen Kongestion diskutiert. Im Jahr 1997 berichteten Morrison und Mitarbeiter [129] über die klinische Anwendung präfabrizierter Hautlappen mit diesem Gefäßstieltyp aus A. und V. epigastric inferior, A. und V. thoracodorsalis und A. und V. temporalis superficialis zur Defektrekonstruktion im Gesichts- und Kniebereich bei drei Patienten. Im Rahmen des postoperativen Verlaufs entwickelten 2 Patienten eine erhebliche venöse Kongestion im Hautlappen. Die venöse Kongestion konnte durch den Einsatz von Blutegeln klinisch überbrückt werden. Pribaz und Mitarbeiter (1999) berichteten ebenso über ihre 10-jährigen klinischen Erfahrungen mit diesem Gefäßstieltyp. Nach der Hautlappenpräfabrikation konnten 15/17 Hautlappen erfolgreich transplantiert werden. Auch diese Autoren beobachteten in den ersten 36 bis 48 postoperativen Stunden eine erhebliche venöse Kongestion bei den meisten ihrer präfabrizierten Hautlappen [151].

In der vorliegenden Studie führten wir die Lappentransplantation in Form eines gestielten Insellappens bei 6 präfabrizierten Hautlappen des Modells mit maximalem Blutfluss mittels arterio-venöser Anastomose (Modell 2 und 3) durch. Im postoperativen Verlauf wurde jedoch nur eine geringe venöse Kongestion beobachtet.

Nach unserer Meinung konnte die venöse Kongestion im Lappen durch den verstärkten Blutfluß im implantierten Gefäßstiel deutlich verringert werden. Demgegenüber ist der venöse Abfluss bei dem Gefäßstiel mit endständiger Ligatur aufgrund der verlangsamten Blutsströmung im Gefäßstiel (nur über Vasa vasorum) erheblich benachteiligt.

6.2.2. Arterio-venöser Gefäßstiel mit endständiger Anastomose

Zeitdauer und Sicherheit der Neovaskularisation bei der Lappenherstellung spielen wegen den entsprechenden Behandlungskosten und individuellen sozioökonomischen Belastungen sowohl für den Patienten als auch für den Chirurgen eine wichtige Rolle. Bei der klinischen Anwendung der Hautlappenpräfabrikation sollten daher die vorhandenen Ressourcen maximal genutzt werden.

Obwohl in zahlreichen Publikationen über die klinische Anwendung präfabrizierter Hautlappen mittels arterio-venöser Gefäßstielimplantation berichtet wurde, sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine Veröffentlichungen über die klinische Verwendung von arterio-venösem Gefäßstiel mit endständiger Anastomose bekannt. Relativ häufig hingegen wurden jedoch arterio-venöse Gefäßstiele mit endständiger Ligatur klinisch verwendet.

In der vorliegenden Arbeit zeigten Szintigraphie, selektive Mikroangiographie und Histologie, dass die Neovaskularisation in präfabrizierten Bauchhautlappen mit maximalem Blutfluss durch endständige A.V. Anastomose signifikant frühzeitiger, großflächiger und sicherer im Vergleich zu minimalem A.V. Blutfluss durch endständige Ligatur war. Im Hinblick auf die schnellere und sicherere Neovaskularisation im präfabrizierten Hautlappen sind wir der Meinung, dass der arterio-venöse Gefäßstiel mit endständiger mikrovasculärer Anastomose deutlich vorteilhafter ist.

Es ist bekannt, dass für erfahrene Mikrochirurgen die mikrochirurgische Gefäßanastomosierung keine Schwierigkeit darstellt und der erforderliche Zeitaufwand begrenzt ist. Auch für den Fall, dass sich p.o. eine Thrombose an der Anastomosenstelle entwickelt, kann man annehmen, dass sich die Neovaskularisation im präfabrizierten Hautlappen wie bei einer endständigen Ligatur weiter entwickeln wird. Aus diesen Gründen sind wir der Meinung, dass die klinische Anwendung von präfabrizierten Gewebslappen mit end-

ständiger Anastomose des arterio-venösen Gefäßstieles in der Zukunft weitere Verbreitung finden wird.

6.2.3. Isolierte arterialisierte venöse Gefäßschlinge

Aufgrund der beschleunigten Ausdehnung und Geschwindigkeit der Neovaskularisation bei Verwendung einer isolierten arterialisierten venösen Gefäßschlinge (Modell 3) eignet sich dieser Gefäßstieltyp hervorragend für die klinische Anwendung.

Der Gefäßstiel in Form einer Venenschlinge wurde experimentell bereits von verschiedenen Autoren beschrieben [61, 73, 86]. Nach Komuro Y. [112] sowie Takato T. [182] konnte eine Venenschlinge den Hautlappen ausreichend neovaskularisieren.

Die wesentlichen Vorteile dieses Gefäßstieltyps bestehen in der Lappenherstellung, Lappentransplantation sowie der minimalen Hebedefektmorbidität.

Die isolierte venöse Gefäßschlinge ist einer der einfachsten zur Verfügung stehenden Gefäßstiele und kann prinzipiell als sehr langer Stiel entnommen werden. Darüber hinaus kann der Gefäßstiel aufgrund der ausreichenden Länge fast immer ohne Problem mit gesunden und geeigneten Spendergefäßen anastomosiert werden.

Bei Verwendung einer Venenschlinge sind Venen mit ausreichend großem Kaliber insbesondere im Extremitätenbereich fast immer vorhanden, so dass die mikrovaskuläre Transplantation im Rahmen der freien Lappen zweifelsohne viel einfacher und zuverlässiger durchzuführen ist.

Aufgrund der konstanten Anatomie des subkutanen Venennetzes bedingt die Entnahme einer venösen Schlinge in der Regel keine Blutflussstörungen. Ebenso sind nur minimale Sensibilitätsstörungen oder Einschränkungen der Gelenkbeweglichkeit im Bereich des Hebedefektes zu erwarten.

Die Herstellung präfabrizierter Gewebslappen mittels Implantation einer isolierten arterialisierten venösen Gefäßschlinge befindet sich gegenwärtig noch im experimentellen Stadium. Eine klinische Anwendung dieser Gefäßstielvariante ist uns aus der Literatur bis heute nicht bekannt. Nachfolgend berichten wir über den ersten klinischen Fall, bei dem dieses Modell durchgeführt und getestet wurde.

Fallbericht:

Im April 2003 stellte sich in der Abteilung für Unfallchirurgie, Orthopädie und Plastische Chirurgie am Univ.-Klinikum Nr. 108 in Hanoi, Vietnam ein 19-jähriger Patient erstmal vor. Anamnestisch hatte er 1996 im Rahmen eines Verkehrsunfalls Verletzungen am linken Unterschenkel und Fuß erlitten. Zu diesem Zeitpunkt war er 6-mal in verschiedenen Krankenhäusern operiert worden. Klinisch lag ein ausgedehnter Weichteilverlust mit Vernarbung am gesamten hinteren Unterschenkel bis zur Ferse, eine Unterschenkelverkürzung von 8 cm sowie eine Spitzfußdeformität mit Sprunggelenkseinstellung vor (siehe Abb. 47.1a – 47.1c).

Nach sorgfältiger Untersuchung und Überlegung wurde entschieden, den operativen Eingriff in zwei Schritten zu gestalten. Zuerst sollte das gesamte geschrumpfte Narbengewebe durch einen großen freien Hautgewebslappen ersetzt werden. Anschließend sollte eine Sprunggelenksversteifung in funktioneller Stellung bei gleichzeitiger Verlängerung des Unterschenkels mittels Fixateur externe durchgeführt werden.

Unter den bekannten mikrovaskulären Lappen stand jedoch kein konstanter und ausreichend großer Hautlappen für den Weichteildefekt in einer Dimension von von etwa 30 x 15cm mit minimaler Hebedefektmobilität zur Verfügung.

Im Kenntnis der Vorteile der Lappenpräfabrikation mittels der isolierten arterialisierten venösen Gefäßschlinge wurde dieses Modell ausgewählt. Zunächst wurde ein präfabrizierter Hautlappen der Größe 30 x 15 cm mit medialer Basis an der Leistenregion hergestellt. Auf dem Wundgrund wurde eine dünne Silikonfolie LPI® (Laboratoire Perouse Implant - Frankreich) entsprechend den Lappenabmessungen (30 x 15 cm) mit fortlaufender Naht (Ethilon 3/0) fixiert. Am linken Oberschenkel wurde die Vena saphena magna dann auf eine Länge von 30 cm vom Leistenband bis zum Knie präpariert. Nach der Präparation wurde die mikrovaskuläre Anastomose zwischen dem distalen Venenstumpf und dem Gefäßstumpf der A. circumflexa femoris lateralis in End-zu-End Einzelknopftechnik mit monofilem Nylon der Stärke 9/0 (Ethicon) durchgeführt. Auf diese Weise entstand eine isolierte arterialisierte venöse Gefäßschlinge aus der Vena saphena magna. Als nächster Schritt wurde diese Gefäßschlinge nach kranial umgeschlagen und unter dem vorbereiteten Hautlappen implantiert. Die Operation wurde mit dem Hautverschluss beendet (siehe Abb. 47.2a – 47.2e).

Gemäß der experimentellen Studie und aufgrund fehlender klinischer Erfahrungen wurde der präfabrizierte Hautlappen 6 Wochen nach der Herstellung als Insellappen unter Erhalt der Gefäßschlinge umschnitten und dann zurückgenäht. Nach einer postoperativen Beo-

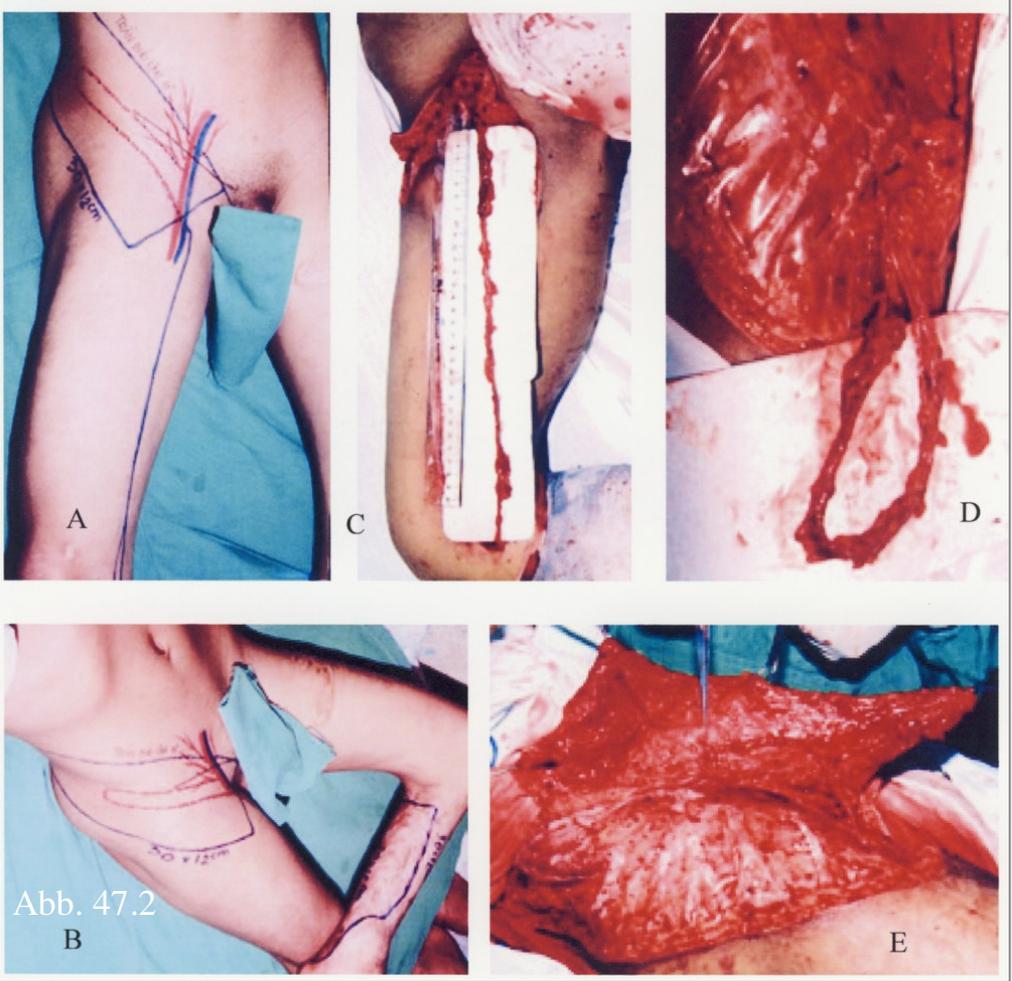
bachtungszeit von 2 Monaten waren der präfabrizierte Hautlappen und alle Hautinzisionen unauffällig abgeheilt (siehe Abb. 47.3a – 47.3d).

Im zweiten Operationsschritt wurde der präfabrizierte Hautlappen nach dem Debridement des vernarbten und geschrumpften Weichteilgewebes an der gesamten Ferse zur Weichteildeckung frei transplantiert. Die mikrovaskuläre Anastomose der implantierten Gefäßschlinge wurde an die A. tibialis posterior in End-zu-Seit Technik und an die V. saphena parva in End-zu-End Technik mit monofilem Nylon der Stärke 9/0 (Ethicon) angeschlossen. Die Spenderstelle an der Leistenregion konnte nach der Lappenhebung primär verschlossen werden.

Im postoperativen Verlauf zeigte sich eine unauffällige Wundeinheilung mit normaler Farbe und Aussehen des präfabrizierten Hautlappens. Interessant war hierbei, dass nur eine ganz geringe venöse Kongestion am Hautlappen postoperativ zu beobachten war. Die Narbe im Bereich der Leiste war klinisch unauffällig (siehe Abb. 47.4a – 47.4e).

Sechs Monate nach der freien Lappentransplantation wurde bei diesem Patient der zweite Operationsschritt mit Sprunggelenkversteifung in funktioneller Stellung und Unterschenkelverlängerung von 8 cm mittels Fixateur externe erfolgreich durchgeführt. Der Patient war mit dem klinischen Ergebnis sehr zufrieden, da er ohne Krücken und orthopädischem Schuhwerk gehen und seinen Beruf als Elektriker wieder ausüben konnte.

Im Rahmen der Behandlung dieses Falls wurde *in vivo* eine selektive Mikroangiographie nach der Hautlappenpräfabrizierung und freien Transplantation vorgenommen. Durch die *in vivo* dargestellten Angiogramme konnten die Gefäßneuaussprossungen und ihre zahlreichen Anschlüsse mit dem bereits im Lappen vorhandenen Gefäßsystem entsprechend den experimentellen Ergebnissen nachgewiesen werden (siehe Abb. 47.5a- 47.5c).



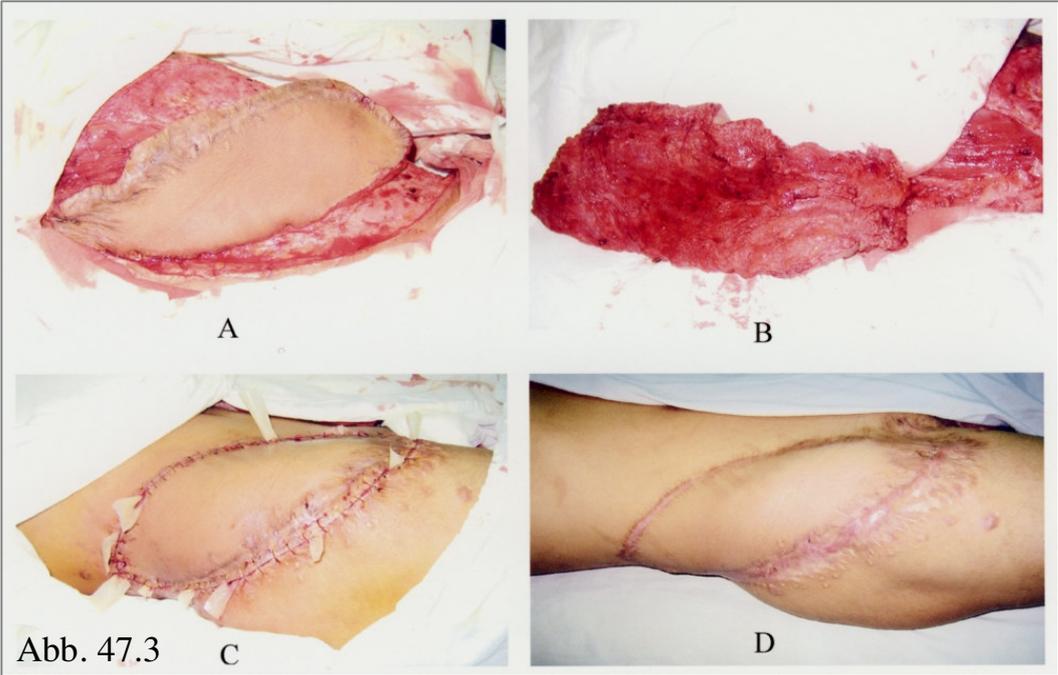


Abb. 47.3



Abb. 47.4

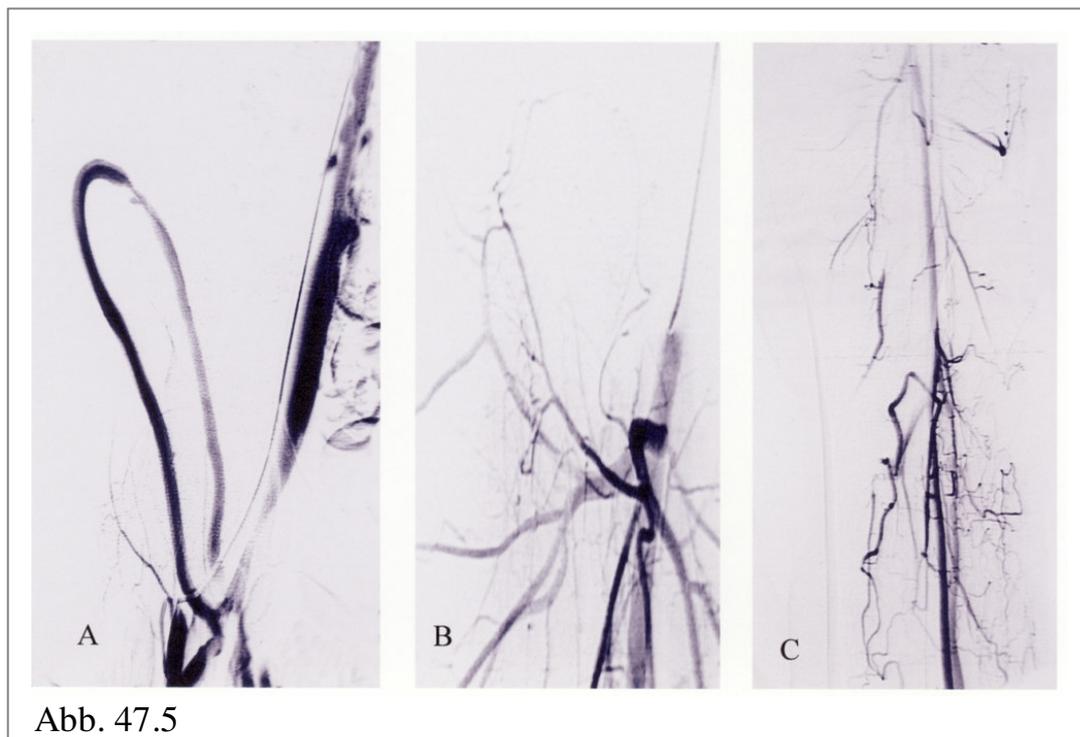


Abb. 47.5

Abb. 47.

- 47.1a – 47.1b: Präoperative Ansicht des ausgedehnten vernarbten Hautweichteildefekts an der Ferse mit Unterschenkelverkürzung von 8 cm; 47.1c: Präoperative Röntgenaufnahme.
- 47.2a – 47.2e: Präoperatives Design eines präfabrizierten Hautlappens in der Leistenregion unter Verwendung einer isolierten arterialisierten venösen Gefäßschlinge aus der Vena saphena magna (2a-2b); Präparation und Hebung der isolierten Vena saphena magna (2c); Herstellung einer arterialisierten venösen Gefäßschlinge durch mikrochirurgische Anastomose am Leistenband zwischen dem distalen Venenstumpf und dem Gefäßstumpf der A. circumflexa femoris lateralis in End-zu-End Einzelknopftechnik (2d); die Implantation der hergestellten venösen Gefäßschlinge an der Unterseite des Hautlappens an der Leistenregion (2e).
- 47.3a – 47.3d: Lappenhebung als ein Insellappen unter Erhalt der implantierten Gefäßschlinge (3a-3b); in situ Wiedereinnähen nach der Lappenhebung (3c); unauffällige Hautlappenvitalität mit physiologischer postoperativer Wundheilung nach der Lappenhebung (3d).
- 47.4a – 47.4e: Ergebnis nach Hautlappenrekonstruktion und Unterschenkelverlängerung von 8 cm (4a-4c); Minimale Hebedefektmorbidität nach primärem Wundverschluss; die Narbe kann gut durch einen Slip verdeckt werden (4d-4e).
- 47.5a – 47.5c: in vivo selektive Angiographie: 1 Woche nach der Präfabrikation (5a); 4 Wochen nach der Präfabrikation (5b); 2 Monate nach der freien Transplantation (5c).

6.2.4. Isolierte arterielle Gefäßschlinge

Obwohl zahlreiche experimentelle Untersuchungen bekannt sind, wurde jedoch bislang die Herstellung von großen präfabrizierten Hautlappen unter Verwendung einer reinen isolierten arteriellen Gefäßschlinge nicht beschrieben. Im Jahr 1990 führten Morrison und Mitarbeiter [128] in Melbourne umfangreiche experimentelle Untersuchungsarbeiten zur Hautlappenpräfabrikation mit Dimensionen von 2 x 3 cm, 3 x 4 cm, und 4 x 5 cm durch, in denen die Autoren über die Verwendung von subkutanen arteriellen Gefäßschlingen (Gruppe 3 des Experiments) als Gefäßstielimplantation berichteten. Diese arterielle Gefäßschlinge wurde jedoch mit einem Veneninterponat aus dem Ohr verlängert, so dass sich die Neovaskularisation im Lappen nach unserer Meinung im Wesentlichen in gleicher Weise wie mit einem arterio-venösen Gefäßstiel entwickeln konnte. Die klinische Anwendung einer isolierten arteriellen Gefäßschlinge zur Hautlappenpräfabrikation ist uns aus der Literatur nicht bekannt.

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnten wir die Verwendung einer isolierten arteriellen Gefäßschlinge zur ausreichenden Neovaskularisation in präfabrizierten Hautlappen nachweisen. Der Vorteil dieses Gefäßstieltyps im Vergleich mit der venösen Gefäßschlinge liegt darin, dass die Durchführung aufgrund der dickeren und stabilen Gefäßwand sicherer ist. Der wesentliche Nachteil ist seine hohe Hebedefektmorbidität und die Limitierung der Spenderareale von Arterien. Nach unserer Meinung kann die Indikation zur Verwendung einer isolierten arteriellen Gefäßschlinge im Gegensatz zur venösen Gefäßschlinge nur in streng ausgewählten Fällen gestellt werden.

6.2.5. Arterio-venöser Gefäßstiel mit Gewebe-Expander

In den letzten dreißig Jahren hat sich die Gewebsexpansion zu einer sehr populären Modalität in der Plastischen und Rekonstruktiven Chirurgie entwickelt. Diese Methode ermöglicht dem rekonstruktiven Chirurgen große Hautlappen mit idealen funktionellen und ästhetischen Charakteristika entsprechend den Erfordernissen des lokalen Hautdefekts im Hinblick auf Sensibilität, Farbe und Dicke, was durch andere chirurgische Operationsverfahren unmöglich, ist, zu produzieren.

Die Hautexpansion wurde klinisch erstmals von Morestin (1913) angewandt, allgemein von C.G. Neumann (1957) eingeführt und von C. Radovan (1984) verbessert [original zit. bei Kastenbauer]. Hautexpander und Injektionsport werden üblicherweise über eine Inzision in die Nähe der Empfängerstelle eingebracht. Der Expander wird anschließend

über einen Zeitraum von etwa 6 Wochen allmählich mit Kochsalzlösung gefüllt, bis die Haut an der Spenderstelle auf zirka die doppelte Fläche gedehnt ist. Im Jahr 1987 berichtete Sasaki über die "rasche" intraoperative Hautexpansion [160]. Diese Methode sollte jedoch nur angewendet werden, wenn in einem Schritt kleine Defekte primär nicht anders verschlossen werden können. Bei der raschen intraoperativen Expansion kann nur eine Oberflächenvergrößerung von bis zu 30% gegenüber der Vergrößerung um ca. 135% bei der traditionellen und langsamen Expansion erreicht werden [105].

Die Hauptnachteile der Hautexpansion sind in der relativ hohen Komplikationsrate in Folge von Traumen, Infektionen und ausgedehnten Vernarbungen begründet. Die Kombination zwischen Hautexpansion und präfabrizierten Lappen gibt den rekonstruktiven Chirurgen die Möglichkeit, die Herstellung wünschenswerter Hautlappen entsprechend den klinischen Anforderungen an Größe, Dicke und Farbe unabhängig von benachbarten Geweben des lokalen Hautweichteildefekts zu realisieren.

Trotz der vielversprechenden Potenz dieses Verfahrens wurden jedoch bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine experimentellen oder klinischen Untersuchungsarbeiten zu dieser Methode in der Literatur veröffentlicht.

In der vorliegenden Studie konnte erstmalig die Untersuchung der Neovaskularisation in präfabrizierten Hautlappen mittels arterio-venöser Gefäßstielimplantation mit endständiger Shuntbildung in Kombination mit Hautlappenexpansion durchgeführt werden.

Im Vergleich mit nichtexpandierten Hautlappen wurde die Neovaskularisation mit Hilfe eines Expanders bei allen Beobachtungszeiträumen signifikant verstärkt. Darüber hinaus konnte die Flächengewinnung des expandierten präfabrizierten Hautlappens bis zu einer durchschnittlichen Größe von $13 \times 16 \text{ cm} = 208 \text{ cm}^2$ (173%) im Vergleich mit der Präexpansion von $15 \times 8 \text{ cm} = 120 \text{ cm}^2$ (100%) erreicht werden. Vier Kaninchen in der Studie wurden aufgrund von Thrombosen im implantierten Gefäßstiel ausgeschlossen. Nach unserer Meinung ist diese Komplikation möglicherweise Folge des Expansionsdrucks.

Aufgrund des Herstellungsverfahrens eignet sich der expandierte präfabrizierte Hautlappen sowohl als freies mikrovaskuläres Transplantat als auch als gestielter Lappen hervorragend zur großen und dünnen Hautweichteildefektrekonstruktion im Gesicht, Hals, Fuß oder an der Hand. Auch bei adipösen Patienten kann diese Lappentechnik in entsprechenden Hautarealen verwendet werden.

Wesentliche Nachteile des Verfahrens sind mögliche Komplikationen des Expanders wie die Perforation, Infektion in der Umgebung des Expanders sowie mögliche Thrombosen im Gefäßstiel aufgrund des Expansionsdrucks. Ein weiterer Nachteil ist die verlängerte ambulante Behandlungszeit während der Expanderfüllung.

Unter Berücksichtigung der Vorteile sollte der expandierte präfabrizierte Hautlappen dadurch als eine wertvolle und praktikable Lösung in ausgewählten Fällen zur Rekonstruktion ausgedehnter Hautweichteildefekte mit minimaler Spenderbezirksmorbidität angesehen werden.

6.3. Präfabrikation freier neovaskularisierter Hautlappen in Kombination mit gezüchteten Knorpelzell-Biomaterialkonstrukten

6.3.1. In vitro gezüchtete Knorpelzell-Biomaterialkonstrukte

Voraussetzung für die Herstellung eines dreidimensional gezüchteten Knorpelzell-Biomaterialkonstruktes ist eine ausreichende Zellzahl, um das benötigte Gewebevolumen mit der gewebetypischen Zelldichte auszufüllen. Zu diesem Zweck müssen im ersten Schritt die isolierten Zellen aus den Knorpelbiopsien im Monolayer-Kultursystem vermehrt werden. Anschließend werden die vermehrten Zellen in einen dreidimensionalen Zellträger übertragen und weiterkultiviert.

Das Hauptproblem der Monolayerkultur ist durch das Phänomen der Dedifferenzierung gekennzeichnet, d. h. der Verlust ihrer morphologischen, biochemischen und physiologischen Eigenschaften. Die Chondrozyten verlieren nach wenigen Tagen in der Monolayerkultur ihre runde Form und nehmen fibroblastenförmige Gestalt an. Hierbei wird die Synthese des knorpelspezifischen Kollagens Typ II abgeschaltet. Stattdessen produzieren die Zellen große Mengen des völlig knorpeluntypischen Kollagen Typ I. Gründe für den Dedifferenzierungsprozess sind vermutlich die Anheftung der Zellen an ein ungeeignetes Substrat, eine ungeeignete Mediumversorgung, das flächenhafte Zellwachstum und die fehlende Ausbildung einer dreidimensionalen extrazellulären Matrix [24].

Für die Knorpelgewebeherstellung müssen jedoch die vermehrten Knorpelzellen in einen Zellträger gebracht und anschließend zu Chondrozyten mit typischen Eigenschaften zurückgebildet werden. Benya und Schaffer (1982) berichteten erstmalig, dass in Agarose eine Redifferenzierung von zuvor dedifferenzierten Chondrozyten hinsichtlich Zell-

form und Kollagensynthese möglich ist. Auch andere Autoren [23, 28, 35, 132] sind der Meinung, dass der Phänotyp von Chondrozyten durch Veränderung der Kulturbedingungen gesteuert werden kann. Durch eine Zellbesiedlung in dreidimensionalen Konstrukten wird die Zellvermehrung gehemmt und die Ausbildung einer gewebstypischen Matrix gefördert [24].

Für die dreidimensional gezüchtete Knorpelgewebeherstellung müssen, neben der entsprechenden Zellanzahl und Zelldichte, geeignete Zellträger zur Zellbesiedlung angewendet werden. Zur Vermeidung einer Verformung und der Gewährleistung stabiler Einsatzmöglichkeiten sollte der Zellträger eine gewisse mechanische Stabilität besitzen. Weiterhin sollte das Leitschienen-Material nur minimale Fremdkörperreaktion auslösen, damit sich eine neue interzelluläre Matrix ungehindert entwickeln kann und die negativen Auswirkungen eines Konstrukterfalls minimiert werden [72, 119, 157].

Gegenwärtig steht zur Generierung von gezüchteten Knorpelzellen ein breites Spektrum von Zellbiokonstrukten mit unterschiedlicher Zusammensetzung und Architektur zur Verfügung. Unabhängig der verwendeten Biokonstrukte sind verschiedene Forschergruppen übereinstimmend zum Ergebnis gelangt, dass bei der Verwendung eines Biokonstruktes immer die Interaktion zwischen Biokonstrukten und dem Gewebe oder Zellen steht. Bei der Anwendung eines Biokonstrukts ist es wichtig, dass die Knorpelzellen bei der Anhaftung ihre runde Form und phänotypische Entwicklung der neu synthetisierten extrazellulären Matrix behalten [24, 29, 132].

Eine Vielzahl von Autoren haben berichtet, dass die Deposition der extrazellulären Matrix bevorzugt an der Peripherie von Biokonstrukten stattfindet. Dahingegen ist die zentrale Region des gezüchteten Gewebes eher arm an Zellen und Matrix [173, 176, 191]. Nach Matin (2006) wird dieses Phänomen auf die ungleichmäßige Zellbesiedlung innerhalb der Konstruktoren bzw. auf Diffusionslimitierungen bei den Zellen im Innenbereich des Biokonstruktes zurückzuführen sein [119].

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung zeigten die Chondrozyten *in vitro* eine gute Vermehrungsfähigkeit mit einem Mittelwert von etwa 4×10^6 vitalen gezüchteten Knorpelzellen nach 3 Passagen. Bereits nach der Monolayerkultur veränderten die Zellen ihr Erscheinungsbild von runden zu mehr sternförmigen fibroblastenähnlichen Zellen. Wenn die vermehrten Zellen auf dreidimensionale Zellträger aus Caprolactone übertragen wurden, kam es jedoch wieder zu einer Redifferenzierung der Zellen. Die Zellen waren

nach dem Redifferenzierungsprozess vor der *in vivo* Implantation in der Lage, ihre knorpelzellähnliche Form zurückzubilden.

Die *in vitro* Ergebnisse der Herstellung von Knorpelzell-Biokonstrukten zeigten, dass die Adhäsion der Zellen an Biomaterialkonstrukte aus Caprolactone gut war und die Vitalität der gezüchteten Knorpelzellen im Konstrukt bei nahezu 100% eruiert wurde.

In dieser Studie zeigte sich, wie in anderen Studien [155, 157] über die "*in-vitro*-Herstellung von gezüchtetem Knorpelgewebe" auch, dass der Einsatz von Wachstumsfaktoren nicht absolut notwendig ist. Der Nachteil der dargestellten Methode besteht jedoch darin, dass sie mit hohem Zeit- und Personalaufwand verbunden ist. Im Rahmen des Tissue Engineering gibt es heute Hinweise auf einen positiven Effekt von Wachstumsfaktoren, wie z. B. von IGF-1 und TGF- β , im Hinblick auf eine schnellere Vermehrung von gezüchteten Chondrozyten [5, 125, 142]. Darüber hinaus wird eine Verbesserung der Zellverteilung in porösen Biokonstrukten durch rotierende Bioreaktoren von vielen Verfassern bestätigt [191, 201]. Nach unserer Meinung sind bei der *in-vitro*-Zellzüchtung und Knorpelzell-Konstrukt-Herstellung weitere tierexperimentelle Untersuchungen mit rotierenden Bioreaktoren und Zusatz von Wachstumsfaktoren von großer Bedeutung.

6.3.2. In vivo präfabrizierte Hautlappen-Knorpelzell-Biomaterialkonstrukte

Das übergeordnete Ziel der zweiten hier dargestellten experimentellen Untersuchung ist die Transplantation von vitalen neovaskularisierten gezüchteten Knorpelgeweben zur dreidimensionalen Rekonstruktion bzw. Reparatur von Knorpeldefekten beim Menschen. Die Neovaskularisierung gezüchteter Knorpelzell-Biokonstrukte stellt nach wie vor eine besondere Herausforderung für den rekonstruktiven Chirurgen dar. Die Vaskularisierung größerer dreidimensionaler gezüchteter Gewebevolumina – unabhängig von den Spenderarealen – konnte in der vorliegenden Arbeit mittels Lappenpräfabrikation im autologen Modell realisiert werden. Diese vital hergestellten Verbundgewebelappen können im Prinzip nach der ausreichenden Neovaskularisation im Hautlappen und in den Biokonstrukten an die Empfängerstelle zur Knorpeldefektrekonstruktion frei oder gestielt transplantiert werden.

Experimentelle *in-vivo*-Untersuchungen des Tissue Engineering von Knorpelgeweben wurden in der Literatur bisher meist an Nacktmäusen durchgeführt, die ein unzureichendes Immunsystem besitzen [29, 35, 60, 69, 98, 192]. Um die experimentellen Arbeiten

näher an klinische Anwendungen heranzuführen, wurde in dieser Studie autologes Knorpelgewebe verwendet. Das Ziel in der Studie II der vorliegenden Arbeit war es, die Präfabrikation und Neovaskularisierung eines axial vaskularisiert vitalen dreidimensionalen Verbundgewebslappens, bestehend aus *in vitro* autologen gezüchteten Knorpelzell-Biomaterialkonstrukten in Verbindung mit präfabrizierten Hautlappen mittels Gefäßstielimplantation zu untersuchen. Am Modell des Kaninchens wurde das poröse Biomaterialkonstrukt aus Caprolactone mit einer Degradationszeit von ca. 2 Jahren verwendet. Die makroskopische Beurteilung der Studie zeigt, dass eine freie mikrovaskuläre Transplantation dieser autologen Verbundgewebslappen experimentell möglich ist. In diesem Verbundhautlappen wurden alle gezüchteten Knorpelzell-Biomaterialkonstrukte gut und stabil gelagert ohne Hinweis auf Entzündung oder Abstoßungsprozesse. Mechanisch waren die gezüchteten Knorpelzell-Konstrukte im Lappen griffstabil nahezu identisch mit nativem Knorpelgewebe. Demgegenüber zeigten sich die Konstrukte ohne Zellen mechanisch von bindegewebigen Konstrukten. Die selektive Mikroangiographie zeigte, dass die gezüchteten Knorpelzell-Konstrukte gut über ein feines und dichtes Gefäßnetz vaskulär integriert waren. Histologisch zeigte sich eine gute Neovaskularisierung in den gezüchteten Biokonstrukten mit stabiler Formbeständigkeit und Gewebeintegration. Durch Alcian-Färbung konnte die Knorpelneubildung in den gezüchteten Biokonstrukten histochemisch nachgewiesen werden.

Zusammenfassend haben die experimentellen Untersuchungsergebnisse gezeigt, dass Biokonstrukte aus Caprolactone ein geeignetes Biomaterial zur Herstellung knorpelartiger Strukturen darstellen. Darüber hinaus konnte eine Kombination von präfabrizierten Hautlappen mittels Gefäßstielimplantation und der Implantation von *in vitro* gezüchteten Knorpelzell-Biokonstrukten zur Herstellung funktioneller Knorpeltransplantate in einem autologen Modell experimentell realisiert werden und damit in entsprechender Situation klinisch gestellt werden.

6.4. Ausblick und Perspektiven in der rekonstruktiven Chirurgie

◆ Experimentelle und klinische Untersuchungen haben gezeigt, dass sich unterschiedliche Gewebe im Zuge der Neovaskularisierung bei der Wundheilung verbinden. Dabei

können unterschiedliche Gewebe aus der Umgebung oder von einem implantierten Gefäßstiel vaskularisiert werden [54, 84, 133].

In der vorliegenden tierexperimentellen Studie hat sich die Neovaskularisation nach der Gefäßstielimplantation bewährt und kann als eine alternative und effektive Methode für die Weichteildefektrekonstruktion im klinischen Alltag betrachtet werden. Unabhängig von Gefäßstielvarianten hat das dargestellte Herstellungsverfahren präfabrizierter Hautlappen mittels Gefäßstielimplantation folgende Vorteile:

1. Jedes Gewebeareal am menschlichen Körper, ohne Beachtung der physiologischen vaskulären Anatomie, könnte durch Gefäßstielimplantation in einen freien axial vaskularisierten Hautlappen umgewandelt werden. Auf diese Weise lässt sich die Wahl der Spenderstelle sehr flexibel gestalten. Zusätzlich könnte ein sehr großes, dünnes oder filigranes Lappengewebe entsprechend den klinischen Anforderungen hergestellt werden.
2. Reduktion der Hebedefektmorbidität durch flexiblere Wahl des Spenderareals mit den Möglichkeiten des primären Wundverschlusses.
3. An Stelle eines möglicherweise anatomisch kleinen und unsicheren Gefäßstieles des Hautlappens könnte ein sicherer transplantierbarer Gefäßstiel geschaffen werden. Die mikrovaskuläre Transplantation von präfabrizierten Hautlappen kann dadurch viel einfacher und zuverlässiger werden. Als interessante Beispiele sind Leisten- und Bauchhautlappen zu nennen. Trotz seiner geringen Hebedefektmorbidität besitzt der freie Leistenhautlappen häufig eine sehr dicke subkutane Fettschicht. Der Gefäßstiel ist kurz, weist häufig anatomische Variationen auf und die Gefäßkaliber sind klein (*A. circumflexa iliaca superficialis*, *V. commitans*). Die freie Transplantation ist deshalb schwierig und komplikationsträchtig. Der Bauchhautlappen ist häufig zu dick und die Bauchwand kann durch die Mitnahme des *Rectus abdominis* Muskels erheblich geschwächt werden. Die freie Transplantation des Leisten- oder Bauchhautlappens könnte jedoch durch Anwendung der präfabrizierten Lappentechnik mittels Implantation einer definierten Gefäßschlinge viel einfacher, günstiger und sicherer werden.
4. Durch Gefäßstielimplantation in unauffälligen Bereichen (wie z. B. Leistenbereich, epigastrischer Bereich) wird der ästhetische Aspekt präfabrizierter Hautlappen signifikant verbessert.

Die Nachteile dieser Prozedur bestehen darin, dass die Operationsmethode unbedingt in zwei Operationsschritten durchgeführt werden muss und eine zusätzliche unerwünschte Narbe an der Gefäßentnahmestelle hinterlässt.

◆ Diese experimentelle Untersuchungsarbeit hat auch gezeigt, dass ein Zeitraum von 3 Wochen nach Gefäßstielimplantation als die minimale Zeitdauer für eine ausreichende Neovaskularisation in präfabrizierten Hautlappen angesehen werden kann, um Lappen im zweiten Schritt der Operation zuverlässig frei oder gestielt zu transplantieren. In der klinischen Anwendung, könnte die Neovaskularisation in präfabrizierten Hautlappen aufgrund unterschiedlicher biologischer Eigenschaften zwischen Tier und Mensch langsamer als im Tierversuch ablaufen [85, 99]. Dementsprechend sollte deshalb die Zeitdauer der Lappenpräfabrikation in der klinischen Routine etwas verlängert werden.

Um diese Technik im klinischen Alltag zu etablieren, stellt sich damit die Frage, wie der Verlauf der ausreichenden Neovaskularisation im präfabrizierten Hautlappen zu verkürzen ist?

Unsere experimentellen Untersuchungen zeigten, dass bei Verwendung einer Silikonfolie die Neovaskularisation in präfabrizierten Hautlappen schneller und sicherer war. Zusätzlich verhinderte die Silikonfolie bzw. der Expander die Neovaskularisation aus dem Gefäßbett unter dem Lappen und erlaubte, den präfabrizierten Hautlappen einfacher und schneller von seiner Unterlage abzuheben.

Weiterhin konnte die Neovaskularisation in präfabrizierten Hautlappen mit maximalem Blutfluss im implantierten Gefäßstiel erheblich verstärkt werden. Der maximale Blutfluss im Gefäßstiel durch arterio-venöse Anastomose spielt zusätzlich eine wichtige Rolle zur Verhinderung der Thrombosebildung. Zur Vermeidung potenzieller langfristiger Komplikationen (wie z. B. Kreislaufinsuffizienz, cardiale Arrhythmie) kann die Gefäßschlinge nach ausreichender Neovaskularisation im Lappen ligiert werden.

Im Laufe der Neovaskularisation in präfabrizierten Hautlappen mit maximalem Blutfluss zeigte das Modell 5 (arterio-venöse Anastomose + Expander) die am stärksten ausgeprägte Neovaskularisation, gefolgt von Modell 2, 3 und 4. Da in der Praxis nur begrenzt Material für reine arterielle Gefäßstiele (Modell 4) zur Verfügung steht und Expander

(Modell 5) das Risiko von Druckthrombosen durch den Expander mit sich bringen, kommen eindeutig Modell 2 und 3 für die klinische Weiterentwicklung in Frage.

Die venöse Abflussstauung in den klinischen Berichte von Morrison (1997) und Pribaz (1999) ist möglicherweise von der endständigen Ligatur des implantierten Gefäßstiels abhängig. Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass die venöse Kongestion durch eine neue arterio-venöse Shuntbildung deutlich verringert werden konnte.

Präfabrizierte Hautlappen, hergestellt entsprechend den klinischen Bedürfnissen (dünne, besonders große, plastisch formbare Gewebelappen) mit minimaler Hebedefektmorbidität, stellen für rekonstruktive Chirurgen eine neues erfolgreiches Werkzeug im Bereich der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie dar.

◆ Ein wichtiger Fortschritt in der rekonstruktiven Chirurgie repräsentiert die Herstellung dreidimensionaler kombinierter Hautlappen mit Integration eines Stützgerüsts. Diese kann aus autologen oder homologen Knochen, Knorpel oder aus alloplastischen Materialien bestehen. Im Rahmen der rekonstruktiven Chirurgie herrscht ein großer Bedarf an Knorpelersatzmaterialien nach Trauma, thermischen Schädigungen, Tumorresektion oder angeborenen Fehlbildungen. Die Herstellung autologer Knorpeltransplantate mit Hilfe des Tissue Engineering bietet die Möglichkeit, vitale funktionelle Transplantate in geeigneten Umfang bereitzustellen.

Die Schaffung von Knorpelkonstrukten mit Hilfe von isoliert gezüchteten Knorpelzellen scheint aufgrund seiner guten Vorraussetzungen mit geringem Hebedefekt durch kleine Knorpelbiopsie für die klinische Anwendung von großer Bedeutung zu sein. Der Nachteil der Methode besteht darin, dass sie technisch schwierig und mit hohem Zeit- und Personalaufwand verbunden ist. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die nötige Zeit zwischen der Entnahme kleiner Teile von autologen Spendermaterial und dem Einbau des gezüchteten Knorpelzell-Biokonstruktes mindestens 3 Wochen beträgt [119, 155].

Bis heute wurden Konzepte für das Tissue Engineering von Knorpelgewebe vorwiegend in tierexperimentellen Studien untersucht. Wenn gezüchtete Knorpelzellen zur Knorpeldefektversorgung in die klinische Anwendung eingeführt werden sollen, muss die Generierung nicht nur technisch reproduzierbar und standardisiert sein, sondern auch einfach

und kostengünstig. Dies spricht für die Entwicklung von Systemen zur Rationalisierung, Überwachung, Kontrolle und Automatisierung der verschiedenen arbeitsintensiven Schritte, um die Kulturtechnik sicher und zuverlässig zu etablieren.

Um die Züchtung und Verteilung von *in vitro* gezüchteten Knorpelzellen innerhalb der Konstrukte zu verbessern, sollten perfektionierte Kultursysteme und rotierende Bioreaktoren entwickelt und verwendet werden [146, 201]. Darüber hinaus könnte der Zusatz von Wachstumsfaktoren zur Verkürzung der *in vitro* Züchtungsdauer sowie zur Erhöhung der Vermehrungsgeschwindigkeit von großer Bedeutung sein [142].

In bisherigen experimentellen Studien wurde als Medium hauptsächlich fetales Kälberserum verwandt. Im Hinblick auf die potenzielle klinische Anwendung von Tissue Engineering, sollte auf fetales Kälberserum aufgrund möglicher Übertragung spezifischer Krankheiten unbedingt verzichtet werden. Versuche mit humanem Serum zeigten, dass im Vergleich zum fetalen Kälberserum gleiche oder sogar höhere Proliferationsraten der Chondrozyten erreicht werden können [70]. Eine andere Alternative wäre der Einsatz von serumfreien Medium [118].

◆ In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass die Herstellung und freie mikrovaskuläre Transplantation eines präfabrizierten Verbundhautlappens aus gezüchteten Knorpelzell-Biokonstrukten und Lappenpräfabrikation mittels Gefäßstielimplantation experimentell möglich ist. In ausgewählten klinischen Fällen zur Knorpelrekonstruktion bei Anwendung dieser Methode sollten die Patienten präoperativ über die nötigen Operationschritte sowie die Zeitdauer der Neovaskularisation im Hautlappen und den erforderlichen Zeitaufwand für die Herstellung der gezüchteten Knorpelzell-Biomaterialkonstrukte besonders aufgeklärt werden. In Hinblick auf die Verkürzung des Zeitaufwands konnten nach unserer Meinung beide Vorbereitungsverfahren (Lappenpräfabrikation und Knorpelzüchtung) gleichzeitig durchgeführt werden.

Die Herstellung von präfabrizierten Hautlappen in Kombination mit Tissue Engineering von Knorpelzellen befindet sich gegenwärtig noch weitgehend im experimentellen Stadium. Die klinische Anwendung und weitere experimentelle Untersuchungen sind abzuwarten.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Die Präfabrikation von axial perfundierten Hautlappen repräsentiert in der Plastischen Chirurgie eine Methode, welche nicht mit den Nachteilen limitierter Verfügbarkeit, suboptimaler anatomischer Eignung und hoher Hebedefektmorbidity konventioneller Weichteillappen behaftet ist. Die Grundidee besteht darin, gestielte Hautlappen unabhängig vom anatomischen Gefäßverlauf an beliebiger Stelle durch die Implantation eines Gefäßträgers entsprechend den klinischen Erfordernissen herzustellen. Mittels "Tissue Engineering" lassen sich vitale dreidimensionale Strukturen originalgetreu „züchten“.

Ziel der ersten Studie war es, standardisierte Untersuchungen zur Neovaskularisation von präfabrizierten Hautlappen nach Implantation verschiedener Gefäßstielvarianten als Grundlage für die klinische Etablierung durchzuführen.

Ziel der zweiten Studie war, im Tiermodell die Neovaskularisation von Kombinationen aus präfabrizierten Hautlappen und Knorpel-Zell-Biomaterialkonstrukten zu studieren und die Eignung solcher Verbundgewebepöcke zur freien mikrochirurgischen Transplantation zu untersuchen.

In der ersten experimentellen Studie wurden bei 134 Chinchilla-Bastard Kaninchen mit 156 Bauchhautlappen untersucht. Diese wurden am rechten Abdomen in einer Größe von 8 x 15 cm unter Mitnahme des Panniculus carnosus mit lateralem Hautbasis gehoben. Zur Vermeidung einer Neovaskularisation aus dem Wundgrund wurde entweder eine Silikonfolie (Modell 1 – 4) oder ein Gewebeexpander (Modell 5) eingebracht. Der Gefäßstiel aus A. femoralis und V. saphena magna wurde in den nachfolgenden Modellen variiert:

Modell 1: Endständige Ligatur des arterio-venösen Gefäßstieles

Modell 2: Endständige mikrovaskuläre arterio-venöse Anastomose des Gefäßstieles

Modell 3: Isolierte arterialisierte venöse Gefäßschlinge

Modell 4: Isolierte arterielle Gefäßschlinge

Modell 5: Endständige mikrovaskuläre arterio-venöse Anastomose des Gefäßstieles in Kombination mit Hautgewebsexpansion

Nach 4, 8, 12, 16 und 20 Tagen wurde die Neovaskularisation in den Hautlappen hinsichtlich Ausdehnung, Form, Dichte und Geschwindigkeit untersucht.

Bei allen Versuchstieren konnte makroskopisch nach 8, 12, 16 und 20 Tagen eine Kapselneubildung zwischen Lappen und Silikonfolie sowie szintigraphisch mit Thalliumchlorid Gefäßaussprossungen aus dem Gefäßstiel und vaskuläre Verbindungen mit dem bereits im Hautlappen vorhandenen Gefäßsystem nachgewiesen werden.

Mittels mikroangiographischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass nach Implantation eines skeletierten Gefäßstieles in ein minderdurchblutetes Gewebsareal zeitabhängig neue Gefäßaussprossungen unabhängig von den Gefäßstielvarianten entstehen. Die Minimalzeit für eine ausreichende Neovaskularisation betrug bei allen Modellvarianten 20 Tage. Dabei war die Geschwindigkeit der Neovaskularisation vom jeweiligen Blutfluss im Gefäßstiel abhängig. Die beste Neovaskularisation war im Modell 5 (maximaler Blutfluss in Kombination mit Hautexpansion) gefolgt von den Modellen 2, 3, und 4 (maximaler Blutfluss) zu beobachten; die langsamste Neovaskularisation fand im Modell 1 (minimaler Blutfluss) statt.

Die angiographischen Befunde konnten histologisch bestätigt werden.

Der Einsatz der Silikonfolie war sowohl im Hinblick auf eine Beschleunigung der Neovaskularisation als auch eine technische Vereinfachung der Abpräparation im zweiten Operationsschritt vorteilhaft.

Insgesamt ließ sich die am stärksten ausgeprägte Neovaskularisation mit Modell 5 erzielen, gefolgt von den Modellen 2, 3 und 4. Da in der Praxis die Verfügbarkeit rein arterieller Gefäßstiele (Modell 4) sehr begrenzt ist und Expander (Modell 5) ein großes Komplikationsrisiko mit sich bringen, bietet sich klinisch primär der Einsatz von Modell 2 und 3 an.

Im zweiten Teil der Studie wurden 6 Chinchilla Bastard Kaninchen Knorpelbiopsien aus dem Ohr entnommen, in Monolayerkulturen vermehrt und anschließend in einem dreidimensionalen Zellträger aus Polycaprolactone besiedelt. Die 3D-Kultur auf Polycaprolactone bewirkte eine Redifferenzierung der in Monolayerkultur eingetretenen Dedifferenzierung. Diese Knorpelzellkonstrukte wurden an der Unterseite von präfabrizierten Hautlappen mit endständiger Anastomose implantiert und nach 6 Wochen Präfabrikationszeit als Verbundgewebelappen gehoben und in situ mikrochirurgisch reimplantiert.

Die makroskopische Beurteilung ergab ein normales und unauffälliges Aussehen. Mechanisch wiesen die Hautlappen-Zell-Konstrukte eine feste Konsistenz auf, welche mit normalem Knorpel vergleichbar war. Mikroangiographisch konnte bei allen Lappen

eine gute Perfusion über den neu implantierten Gefäßstiel nachgewiesen werden. Die Knorpel-Zell-Konstrukte waren über ein feines und dichtes Gefäßnetz vaskularisiert.

Histologisch konnte die gute Neovaskularisation und die Bildung von knorpelähnlichem Gewebe bestätigt werden. Die knorpelähnlichen Zellen zeigten eine gute Zelladhäsion ohne Hinweis auf Zellnekrose oder Entzündungsreaktionen.

Zusammenfassend konnte mit der Kombination von Tissue Engineering und freier präfabrizierter Hautlappen ein vielversprechender Ansatz für den klinischen Einsatz geliefert werden. In gleicher Weise hat die Hautlappenpräfabrikation mit Gefäßstielimplantation ein großes klinisches Potential.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abbase El- H.A., Shenaq S.M., Spira M., El-Falaky M.H. Prefabricated flaps: experimental and clinical review. *Plast Reconstr Surg.* 96; (1995); 1218-25.
2. Aigner J., Tegeler J., Hutzler P., Campoccia D., Pavesio A., Hammer C., Kastenbauer E., Naumann A. Cartilage tissue engineering with a novel nonwoven structured biomaterial based on hyaluronic acid benzyl ester. *J Biomed Mater res.* 42; (1998); 172-181.
3. Anderer U., Libera J. In vitro engineering of human autogenous cartilage. *J Bone Miner Res.* 17; (2002); 1420 –1429.
4. Angel M.F., Chang B., Clark N., Wong L., Ringelman P., Manson P. Further clinical use of the interposition arteriovenous loop graft in free tissue transfers. *Microsurg.* 14; (1993); 479 - 481.
5. Angele P., Faltermeier H., Kujat R., Maghsudi M., Moller H.D., Nerlich M. Improvement of the amplification rate of human chondrocytes with IGF-I and RGD. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd.* 115; (1998); 205-208.
6. Aptekar R.G., Davie J.M., Cattell H.S. Foreign body reaction to silikon rubber: complication of a finger joint implant. *Clin Orthop.* 98; (1974); 231 - 232.
7. Atabey A., McCarthy E., Manson P., Vander K.C.A. Prefabrication of combined composite (chimeric) flaps in rats. *Ann Plast Surg.* 45; (2000); 581-588.
8. Austad E.D., Thomas S.B., Pasyk K. Tissue expansion: dividend or loan? *Plast Reconstr Surg.* 78; (1986); 63-67.
9. Bakamjian V.Y. A two staged method for pharyngoesophageal reconstruction with a primary pectoral skin flap. *Plast Reconstr Surg.* 36; (1965); 173.
10. Barone R, Pavaux C., Blin P.C., Cuq P. *Atlas D`Anatomie du Lapin (Atlas of rabbit anatomy).* Masson & Cie, Editeurs, Saint-Germain Paris (1973); 131-139.
11. Barrow D.L., Nahai F., Tindall G.T. The use of the greater omentum vascularized free flaps for neurosurgical disorders requiring reconstruction. *J Neurosurg.* 60; (1984); 305-311.
12. Baudet J., Guimberteau J.C., Nascimento E. Successful clinical transfer of two free thoraco-dorsal axillary flaps. *Plast Reconstr Surg.* 58; (1976); 680-688.
13. Benya P.D., Schaffer J.D. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell.* 30; (1982); 215-224.
14. Berger A., Schneider W. Prefabricated microsurgical tissue units : progress over the past 9 year. *Microsurg.* 14; (1993); 241–243.

-
15. Berghaus A. Alloplastic implants in head and neck surgery. *Eur Arch Otorhinolaryngol. Suppl.* 1; (1992); 53-95.
16. Berghaus A., Axhausen M., Handrock M. Poröse Kunststoffe für die Ohrmuschelplastik. *Laryngol Rhinol Otol.* 62; (1983); 320-327.
17. Beyer M., Hoffer H., Mierdl S., Beyer U., Hannekum A. Neoangiogenese nach Transplantation eines freien Skelettmuskellappens auf das Myokard des Hundes. *VASA.* 21; (1992); 132-137.
18. Biemer E., Duspiva W. *Reconstructive microvascular surgery.* Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1982); 3-29; 105-42.
19. Bilgen B., Sucosky P., Neitzel G.P., Barabino G.A. Flow characterization of a wavy-walled bioreactor for cartilage tissue engineering. *Biotechnol Bioeng.* 20; (2006); 1009-1022.
20. Blunk T., Siemenski A.L., Gooch K.J., Courter D.L., et al. Differential effects of growth factors on tissue-engineered cartilage. *Tissue Eng.* 8; (2002); 73-84.
21. Braley S.A. Biomaterials in clinical use. *Biomater Med Devices Artif Organs.* 3; (1974); 225-234.
22. Braley S.A. The use of silikon in plastic surgery: a retrospective view. *Plast Reconstr Surg.* 51; (1973); 280-288.
23. Brobman G.F., Huber J. Effects of different-shaped tissue expanders on transluminal pressure, oxygen tension, histopathologic changes and skin expansion in pigs. *Plast Reconstr Surg.* 76; (1985); 731-736.
24. Bujia, J. Die Züchtung von autologem Knorpelgewebe für die rekonstruktive Chirurgie: Möglichkeiten und Grenzen. *Laryngo-Rhino-Otol.* 74; (1995); 205-210.
25. Buncke H.J., Schulz W.P. Experimental digital amputation and reimplantation. *Plast Reconstr Surg.* 36; (1965); 62-66.
26. Burian F. *Atlas der Plastischen Chirurgie. Allgemeine Teil 1.* S. Kager; Basel-München-Paris-London-New York-Sydney. (1978); 1-95.
27. Campoccia D., Doherty P., Radice M., et al. Semisynthetic resorbable materials from hyaluronen esterification. *Biomaterials.* 19; (1998); 2101-2127.
28. Cao Y., Rodriguez A., Vacanti M., et al. Comparative study of the use of poly (glycolic acid), calcium alginate and pluronics in the engineering of autologous porcine cartilage. *J Biomater Sci Polym Ed.* 9; (1998); 475-487.
29. Cao Y., Vacanti J.P., Paige K.T., Upton J., Vacanti C.A. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast Reconstr Surg.* 100; (1997); 297-304.

- 30.** Cavadas P.C., Baena - Montila P., Vera P. Experimental tracheal reconstruction with free prefabricated arterialized venous flap. *Eur J Plast Surg.* 17; (1994); 322-327.
- 31.** Cavadas P.C., Vera-Sempere F.J. Prefabrication of a vascularized nerve graft by vessel implantation: preliminary report of an experimental model. *Microsurg.* 15; (1994); 877-881.
- 32.** Chang S.C., Rowley J.A., Tobias G., et al. Injection molding of chondrocyte/alginate constructs in the shape of facial implants. *J Biomed Mater Res.* 55; (2001); 503-511.
- 33.** Cherry G.W., Austad E., Pasyk K., Mc Clatchey K., Rohrich R.J. Increased survival vascularity of random-pattern skin flaps elevated in controlled, expanded skin. *Plast Reconstr Surg.* 5; (1983) 680-685.
- 34.** Chul Tark K., Khouri R.K., Shun S.K., Shaw W.W. The fasciovascular pedicle for revascularisation of other tissues. *Ann Plast Surg.* 26; (1991); 149-155.
- 35.** Cima L.G., Vacanti J.P., Vacanti C., et al. Tissue engineering by cell transplantation using degradable polymer substrates. *J Biomech Eng.* 113; (1991); 143-151.
- 36.** Clarke H.M., Howard C.R., Pynn B.R., Mc Kee N.H. Delayed neovascularization in free skin flap transfer to irradiated beds in rats. *Plast Reconstr Surg.* 75; (1985); 560-564.
- 37.** Cobbett J.R. Free digital transfer. Report of a case of transfer of great toe to replace an amputated thumb. *J Bone Joint Surg.* 51B; (1969); 677.
- 38.** Converse J.M. *Reconstructive plastic surgery.* Vol. 1; Kap. 1; W. B. Saunders, Philadelphia.
- 39.** Costa H., Cunha C., Guimares I., Comba S., Malta A., Lopes A. Prefabricated flaps for the head and neck: a preliminary report. *Br J Plast Surg.* 46; (1993); 223-227.
- 40.** Cutting C., Bardach J., Rosewall D. Skin flap delay procedures: proximal versus distal delay. *Ann Plast Surg.* 4; (1980); 293-6.
- 41.** Daniel R.K., Taylor G.I. Digital transfer of an island flap by microvascular anastomoses: a clinical technique. *Plast Reconstr Surg.* 52; (1973); 111.
- 42.** Devansh S. Neo-flaps for facial reconstruction: can we create the desired thin-skin flaps? *Plast Reconstr Surg.* (1998); 1633-1638.
- 43.** Dos Santos L.F. The vascular anatomy and dissection of the free scapular flap. *Plast Reconstr Surg.* 73; (1984); 599-604.
- 44.** Dustman H.O., Puhl W., Kempfen B. Die Zellteilung im Gelenkknorpel. *Arch Orthop Unfall-Chir.* 79; (1974); 171-182.

- 45.** Duarte A., Valauri F.A., Buncke H.J. Creating a free muscle flap by neovascularization: an experimental investigation. *J Reconstr Microsurg.* 4; (1987); 15-18.
- 46.** Duffy F.J., Pribaz J.J., Hergueter C.A., Maitz P.K.M. Flap prefabrication using an exteriorised vascular pedicle in a rabbit ear model. *Br J Plast Surg.* 46; (1993); 279-284.
- 47.** Ehrenfeld M., Riediger D., Schwenzer N. Zur Problematik des Hautersatzes unter besonderer Berücksichtigung des Gewebeexpanders. *Forsch Kiefer-Gesichtschir.* 35; (1989); 161-164.
- 48.** Erk Y., Rose F.A., Spira M. Vascular augmentation of skin and musculocutaneous flaps. *Ann Plast Surg.* 10; (1983); 341-348.
- 49.** Erol O. The transformation of a free skin graft into a vascularized pedicled flap. *Plast Reconstr Surg.* 58; (1976); 470-477.
- 50.** Erol O., Spira M. Development and utilization of a composite island flap employing Omentum: experimental investigation. *Plast Reconstr Surg.* 65; (1980); 405-418.
- 51.** Erol O., Spira M. Utilization of a composite island flap employing omentum in organ Reconstruction: an experimental investigation. *Plast Reconstr Surg.* 68; (1981); 561-570.
- 52.** Erol O., Spira M. Omentum island skin graft flap. *Surg Forum* 29; (1978); 594-596.
- 53.** Erol O., Spira M. Secondary musculocutaneous flap: an experimental study. *Plast Reconstr Surg.* 65; (1980); 277-282.
- 54.** Erol O., Spira M. Development and utilization of a composite island flap employing omentum: experimental investigation. *Plast Reconstr Surg.* 65; (1980a); 405-18.
- 55.** Falco N.A., Pribaz J.J., Eriksson E. Vascularization of skin following implantation of an arteriovenous pedicle: implications in flap prefabrication. *Microsurg.* 13; (1992); 249-254.
- 56.** Fayad J., Kuriloff D.B. Prefabricated microvascular autograft in tracheal reconstruction. *Otolaryngol. -Head and Neck Surg.* 111; (1994); 396-406 .
- 57.** Fisher J., Yang W.Y. Experimental tissue molding for soft - tissue reconstruction: a preliminary Report. *Plast Reconstr Surg.* 82; (1988); 857-864.
- 58.** Folkmann J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res.* 43; (1985); 175-203.
- 59.** Fowler J.D., Miller C.W., Bowen V., Johnston G.H. Transfer of free vascular cutaneous flaps by microvascular anastomosis. Results in six dogs. *Vet Surg.* 16; (1987); 446-50.
- 60.** Freed L.E., Marquis J.C., Nohria A., et al. Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. *J Biomed Mat Res.* 27; (1993); 11-23.

- 61.** Freedman A.M., Meland N.B. Arteriovenous shunts in free vascularized tissue transfer for extremity reconstruction. *Ann Plast Surg.* 23; (1989); 123-128.
- 62.** Furukawa H., Yamamoto Y., Kimura C., et al. Clinical application of expanded free flaps based on primary or secondary vascularization. *Plast Reconstr Surg.* 102; (1998); 1532-1536.
- 63.** Garcia P.B., Nieto C.S., Ortega J.M.R. Morphological changes in the vascularization of delayed flaps in rabbits. *Brit J Plast Surg.* 44; (1991); 285-290.
- 64.** Gatti J.E., Larossa D., Brousseau D.A., Silverman D.G. Assessment of neovascularization and timing of flap division. *Plast Reconstr Surg.* 73; (1984); 396-402.
- 65.** Gayou R.M. A histological comparison of contracted and non-contracted capsules around silicone breast implants. *Plast Reconstr Surg.* 63; (1979); 700-707.
- 66.** Geishauser M., Schwarz M. Freie mikrovaskuläre und axialgestielte Lappen. Verlag Hans Hube, Bern. (1995); 11- 227.
- 67.** Germann G., Pelzer M., Sauerbier M. Vorfabrizierte Lappenplastiken (Prefabricated flaps) Ein neues rekonstruktives Konzept. *Othopäde.* 27; (1998); 451-456.
- 68.** Graf P. Hautweichteilrekonstruktionen am Fuß: Untersuchungen zur Prognose und Wertigkeit von Lappenplastiken mit dynamischer Pedographie. Habilitation an der TUM. (1994); 1-95.
- 69.** Grande D.A., Halberstadt C., Naughton G., Schwartz R., Manji R. Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts. *J Biomed Mat Res.* 34; (1997); 211-220.
- 70.** Gruber R., Sittinger M., Bujia J. Untersuchungen zur in vitro Kultivierung von Humanchondrozyten bei Einsatz von Humanserum als Mediumzusatz: Minimierung des möglichen Risikos einer Infektion mit Erregern von Prionen-Erkrankung. *Laryngo-Rhino-Otol.* 75; (1996); 105-108.
- 71.** Haisch A., Klaring S., Groger A., Gebert C., Sittinger M. A tissue-engineering model for the manufacture of auricular-shaped cartilage implants. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 259; (2002); 316-321.
- 72.** Haisch A., Schultz O., Perka C., et al. Tissue Engineering humanen Knorpelgewebes für die rekonstruktive Chirurgie unter Verwendung eines biokompatiblen resorbierbaren Fibringels und Polymervliesstrukturen. *HNO.* 44; (1996); 624-629.
- 73.** Hallock G.G. The interposition arteriovenous loop revisited. *J Reconstr Microsurg.* 4; (1988); 155-159.
- 74.** Hallock G.G. Repair of an untreated cleft palate in an adult using a prefabricated radial forearm flap. *Ann Plast Surg.* 38; (1997); 69-73.

- 75.** Harii K., Ohmori K., Ohmori S. Hair transplantation with free scalp flaps. *Plast Reconstr Surg.* 53; (1974); 410-413.
- 76.** Harii K., Ohmori K., Torii S. Free gracilis muscle transplantation with microvascular anastomoses for the treatment of facial paralysis. A preliminary report. *Plast Reconstr Surg.* 57; (1976); 133-142.
- 77.** Hellmich S. Fehler und Gefahren bei der freien Knorpeltransplantation im Gesichtsbereich HNO. 30; (1982); 140-144.
- 78.** Hickey M.J., Wilson Y., Hurley J.V., Morrison W.A. Mode of vascularization of control and basic fibroblast growth factor-stimulated prefabricated skin flaps. *Plast Reconstr Surg.* (1998); 101; 1296-1304.
- 79.** Hinchcliff K.W., MacDonald D.R., Lindsay W.A. Pedicle skin flaps in ponies: viable length is related to flap width. *Equine Vet J.* 24; (1992); 26-9.
- 80.** Hirase Y., Valauri F.A., Buncke H.J. Neovascularized free cutaneous cartilage flap transfer with microsurgical anastomosis: an experimental model in rabbits. *Ann Plast Surg.* 21; (1988); 342-347.
- 81.** Hirase Y., Valauri F.A., Buncke H.J. Prefabricated sensate myocutaneous and osteomyocutaneous free flaps: an experimental model. Preliminary Report. *Plast Reconstr Surg.* 82; (1988); 440-446.
- 82.** Hirase Y., Valauri F.A., Buncke H.J. Neovascularized free fat flaps: an experimental model. *J Reconstr Microsurg.* 4; (1988a); 197-201.
- 83.** Hirase Y., Valauri F.A., Buncke H.J. Neovascularized free cutaneous cartilage flap transfer with microsurgical anastomosis: an experimental model in the rabbit. *Ann Plast Surg.* 21; (1988b); 342-7.
- 84.** Hirase Y., Valauri F.A., Buncke H.J. Neovascularized bone, muscle and myosseous free flaps: an experimental model. *J Reconstr Microsurg.* 4; (1988c); 209-215.
- 85.** Hirase Y., Valauri F.A., Buncke H.J. Creation of neovascularized free flaps using vein grafts as pedicles: a preliminary report on experimental models. *Br J Plast Surg.* 42; (1989b); 216-22.
- 86.** Hollander A.P., Dickinson S.C., Sims T.J., Brun P., Cortivo R., Kon E., et al. Maturation of tissue engineered cartilage implanted in injured and osteoarthritic human knees. *Tissue Eng.* 12; (2006); 1787-1798.
- 87.** Holle J., Vinzenz K., Würinger E., Kulenkampff K.J. Saidi M. The prefabricated combined scapular flap for bony and soft-tissue reconstruction in maxillofacial defects: a new method. *Plast Reconstr Surg.* 98; (1996); 542-52.
- 88.** Hom D.B., Baker S.R., Graham L.M., Mc Clatchey K.D., Arbor A. Utilizing angiogenic agents to expedite the neovascularization process in skin flaps. *Laryngoscop.* 98; (1988); 521-526 .

- 89.** Homma K., Ohura T., Sugihara T., Yoshida T., Hasegawa T. Prefabricated flaps using tissue expander: an experimental study in Rats. *Plast Reconstr Surg.* 91; (1993); 1098-1109.
- 90.** Homminga G.N., Buma P., Koot H.W., van der Kraan P.M., van den Berg W.B. Chondrocyte behaviour in fibrin glue in vitro. *Acta Orthop Scand.* 64; (1993), 441-445.
- 91.** Hörl H.W., Klöppel M., Biemer E. Prefabricated free flaps with vascularized porous polytetrafluorethylene (proplast II) frameworks in a rabbit model. *Eur J Plast Surg.* 17; (1994); 144-150.
- 92.** Hutmacher D.W. Scaffold in tissue engineering bone and cartilage. *Biomater.* 21; (2000); 2529-2543.
- 93.** Hutmacher D.W., Schantz T., Zein I., et al. Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modelling. *J Biomed Mater Res.* 55; (2001); 203-216.
- 94.** Hyakusoku H., Okubo M., Umeda T., Fumiiri M. A prefabricated hair - bearing island flap for lip reconstruction. *Br J Plast Surg.* 40; (987); 37-39.
- 95.** Im M.J., Beil R.J., Wong L., Angel M.P., Manson P.N. Effects of sympathetic denervation and oxygen free radicals on neovascularization in skin flap. *Plast Reconstr Surg.* 92; (1993); 736-743.
- 96.** Imber G., Schwager R.G., Guthrie R.H., Gray G.F. Fibrous capsule formation after subcutaneous implantation of synthetic materials in experimental animals. *Plast Reconstr Surg.* 54; (1974); 183-6.
- 97.** Inada Y., Fukui A., Tamai S., Mizumoto S. The arterialized venous flap: experimental studies and a clinical Case. *Br J Plast Surg.* 46; (1993); 61-67.
- 98.** Isogai N., Landis W., Kim T.H., et al. Formation of phalanges and small joints by tissue engineering. *J Bone Joint Surg. (Am)* 81; (1999); 306-316.
- 99.** Itoh Y. An experimental study of prefabricated flaps using silicone sheets, with reference to the vascular patternization process. *Ann Plast Surg.* 28; (1992); 140-146.
- 100.** Itoh Y., Arai K. Nasal reconstruction with a thin, free flap prefabricated with a silicone sheet: case report. *J Reconstr Microsurg.* 8; (1992); 359-362.
- 101.** Jurkiewicz M.J., Nahai F. The omentum: It´s use as a free vascularized graft for reconstruction of the head and neck. *Ann Surg.* 195; (1982); 756-765.
- 102.** Komatsu S., Tamai S. Successful replantation of a completely cut-off thumb. *Plast. Reconstr. Surg.* 42; (1968); 374-377.
- 103.** Katsaros J., Schustermann M., Beppu M., Banis J.C., Acland R.D. The lateral upper arm flap: Anatomy and clinical applications. *Ann Plast Surg.* 12; (1984); 489-496.

- 104.** Kaufmann R., Landes E. Dermatologische Operationen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York. (1987); 37-50.
- 105.** Kastenbauer E.R., Tardy E. Ästhetische und Plastische Chirurgie an Nase, Gesicht und Ohrmuschel. Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York. (1999); 307-323.
- 106.** Kellner K., Schulz M.B., Göpferich A., Blunk T. Insulin in tissue engineering of cartilage: a potential model system for growth factor application. *J Drug Target* 9; (2001); 439-448.
- 107.** Khouri R.G., Koudsi B., Reddi H. Tissue transformation into bone in vivo: a potential practical Application. *JAMA*. 266; (1991); 1953-1955.
- 108.** Khouri R.K., Upton J., Shaw W.W. Prefabrication of composite free flaps through staged transfer: an experimental and clinical study. *Plast Reconstr Surg*. 87; (1991); 108-115.
- 109.** Khouri R.K., Upton J., Shaw W.W. Principles of flap prefabrication. *Clin Plast Surg*. 19; (1992); 763-771.
- 110.** Klöppel M. Vaskularisierbare, poröse Kunststoffe als Gerüstmaterial in präformierten, freitransplantierbaren, hautgedeckten Lappen. Dissertation; TUM; (1994).
- 111.** Ko C.Y., Shaw W.W. Durability of prefabricated versus normal random flaps against a bacterial challenge. *Plast Reconstr Surg*. 99; (1997); 372-7.
- 112.** Komuro Y., Takato T., Yamada A., Yonehara Y. Experimental study of prefabricated flaps using vein grafts. *J Reconstr Microsurg*. 9; (1993); 373-379.
- 113.** Kostakoglu N., Manek S., Green C.J. The development of neovascularisation in flap prefabrication with vascular implantation: an experimental study. *Br J Plast Surg*. 5; (1997); 428-434.
- 114.** Kostakoglu N., Manek S., Terenghi G., Polak J.M., Green C.J. Free sensate secondary skin flaps: an experimental study on patterns of reinnervation and neovascularisation. *Br J Plast Surg*. 47; (1994); 1-9.
- 115.** Liebich H.G. Funktionelle Histologie. Schattauer Verlag, Stuttgart. (1990); 274-283.
- 116.** Maitz P.K.M., Pribaz J.J., Duffy F.J., Hergueter C.A. The value of the delay phenomenon in flap prefabrication: an experimental study in rabbits. *Br J Plast Surg*. 47; (1994); 149-154.
- 117.** Maitz P.K.M., Pribaz J.J., Hergueter C.A. Manipulating prefabricated flaps: an experimental study examining flap viability. *Microsurg*. 15; (1994); 624-629.
- 118.** Mandl E.W., Van der Veen S.W., Verhaar J.A., Van Osch G.J. Serum-free medium supplemented with high-concentration FgF2 for cell expansion culture of human ear chondrocytes promotes redifferentiation capacity. *Tiss Eng*. 8; (2002); 573-580.

- 119.** Matin I. Züchtung von dreidimensionalen Knorpeltransplantaten. *Praxis.* 95; (2006); 841-844.
- 120.** Martinot-Duquennoy V. Prefabrication of thin transferable axial-pattern skin flaps. *Br J Plast Surg.* 44; (1991) 472.
- 121.** McCarthy C. *Plastic surgery general principles. Vol 1.* W.B. Saunders, Philadelphia USA, Eastbourne, East Sussex, UK. (1990); 275-348, 475-82.
- 122.** Mc Graw J., Furlow L. The dorsalis pedis arterialized flap. A clinical study. *Plast Reconstr Surg.* 55; (1975); 177-185.
- 123.** McLean D.H., Bruncke H.J. Autotransplant of omentum to a large skalp defect with microsurgical revascularization. *Plast Reconstr Surg.* 49; (1972); 268-274.
- 124.** Mcleod T.M., Williams G., Sanders R., Green C.J. Prefabricated skin flaps in a rat model based on dermal replacement matrix Permacol. *Br J Plast Surg.* 56; (2003); 775-783.
- 125.** Miehle N.M. Präfabrizierter Lappen im Kaninchenmodell: autologes Tissue Engineering von Knorpel an verschiedenen Implantationsorten. Dissertation; TUM; (2005); 1-56.
- 126.** Millican P.G., Poole M.D. Peripheral neovascularization of muscle and musculocutaneous flaps. *Br J Plast Surg.* 38; (1985); 369-374.
- 127.** Mir y Mir L. Follow-up clinic: Functional graft of the heel. *Plast Reconstr Surg.* 55; (1975); 702-703.
- 128.** Morrison W.A., Doi K., Hurley J.V., Hickey M.J., McO'Brien B. Prefabrication of thin transferable axial-pattern skin flaps: an experimental study in rabbits. *Br J Plast Surg.* 43; (1990); 645-54.
- 129.** Morrison W.A., Penington A.J, Kumta S.K., Callan P. Clinical applications and technical limitations of prefabricated flaps. *Plast Reconstr Surg.* 99; (1997); 378-85.
- 130.** Mutaf M., Tasaki Y., Fujii T. Is bed isolation necessary during prefabrication? an experimental study in rats. *Ann Plast Surg.* 33; (1994); 392 - 400.
- 131.** Naumann A., Rotter N., Bujia J., Aigner J. Tissue Engineering of autologous cartilage transplants for rhinology. *Am Rhinol.* 12; (1998); 59-63.
- 132.** Neumeister M.W., Wu T., Chambers C. Vascularized Tissue-Engineered Ears. *Plast Reconstr Surg.* 117; (2006); 116-122.
- 133.** Nguyen T. Hoang. Die Neovaskularisation im präformierten Lappen in Abhängigkeit vom arteriovenösen Blutfluss des implantierten Gefäßstiels. Med. Diss. TU München (1997).

- 134.** Nguyen T. Hoang, Klöppel M., Staudenmaier R., Biemer E. Experimentelle Untersuchung der Neovaskularisation in großen präfabrizierten Gewebelappen nach arteriovenöser Gefäßstielimplantation. *Handchir Mikrochir Plast Chir.* 36; (2004); 212-217.
- 135.** Nguyen T. Hoang, Kloepfel M., Staudenmaier R., Werner J., Biemer E. Prefabrication of large fasciocutaneous flaps using an isolated arterialised vein as implanted vascular pedicle. *Br. J. Plast. Surg.* 58; (2005); 632-639.
- 136.** Nguyen T. Hoang, Kloepfel M., Staudenmaier R., Schweinbeck S., Biemer E. Neovascularization in prefabricated flaps using a tissue expander and an implanted arteriovenous pedicle. *Microsurg.* 25; (2005); 213-219.
- 137.** Nguyen T. Hoang, Kloepfel M., Werner J., Staudenmaier R., Biemer E. Proposed new method for angiographically quantifying neovascularization in prefabricated flaps. *Microsurg.* 25; (2005); 220-226.
- 138.** Nguyen T. Hoang, Kloepfel M., Staudenmaier R., Werner J., Biemer E. Study of the neovascularisation process in flap prefabrication using a silicone sheet and an isolated arterial pedicle. *Scand J Plast Reconstr Hand Surg.* 39; (2005); 326-333.
- 139.** O'Brien B.M., MacLeod A.M., Hayhurst J.W. Successful transfer of a large island flap from the groin to the foot by microvascular anastomosis. *Plast Reconstr Surg.* 52; (1973); 271.
- 140.** Ono H., Tamai S., Yajima H., et al. Blood flow through prefabricated flaps - an experimental study in rabbits. *Br J Plast Surg.* 46; (1993); 449-455.
- 141.** Osborn K.D., Trippel S.B., Mankin H.J. Growth factor stimulation of adult cartilage. *J Orthop Res.* 7; (1989); 299-310.
- 142.** Osch G.J. van, Veen S.W. van, Burger E.H., Verwoerd-Verhoef H.L. Chondrogenic potential of in vitro multiplied rabbit perichondrium cells cultured in alginate beads in defined medium. *Tiss Eng.* 6; (2000); 321-330.
- 143.** Özbek M.R., Kutlu N., Khouri R.K., Gültan S.M., Yormuk E. Prefabricated microvascular shoulder free flap for forehead reconstruction. *Handchir Mikrochir Plast Chir.* 25; (1993); 139-143.
- 144.** Özgentas H.E., Shenaq S., Spira M. Prefabrication of a secondary TRAM Flap. *Plast Reconstr Surg.* 95; (1995); 441-449.
- 145.** Pasyk K.A., Argenta L.C., Austad E.D. Histopathology of human expanded tissue. *Clin Plast Surg.* 14; (1987); 435.
- 146.** Pei M., Solchaga L.A., Seidel J., et al. Bioreactors mediate the effectiveness of tissue engineering scaffolds. *FASEB J.* 16; (2002); 1691-1694.

-
- 147.** Pennington D.G., Lai M.F, Pelly A.D. The rectus abdominis myocutaneous free flap. *Br J Plast Surg.* 33; (1982); 277-282.
- 148.** Pirsig W., Bean J.K., Lenders H., Verwoerd C.D., Verwoerd-Verhoef H.L. Cartilage transformation in a composite graft of demineralized bovine bone matrix and ear perichondrium used in a child for the reconstruction of the nasal septum. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 32; (1995); 171-181.
- 149.** Piza-Katzer H., Schaden W. Wie lange ist ein mikrovaskulär transplantiertes muskulokutaner Lappen von seinem Gefäßstiel abhängig? *Handchir Mikrochir Plast Chir.* 23; (1991); 169-73.
- 150.** Pribaz J.J., Maitz P.K.M., Fine N.A. Flap prefabrication using the "vascular crane" principle: an experimental study and clinical application. *Br J Plast Surg.* 47; (1994); 250-256.
- 151.** Pribaz J.J., Fine N., Orgill D.P. Flap prefabrication in the head and neck: a 10-year experience. *Plast Reconstr Surg.* 103; (1999); 808-820.
- 152.** Pribaz J.J., Fine N.A. Prefabricated and prelaminated flaps for head and neck reconstruction. *Clin Plast Surg.* 28; (2001); 261-272.
- 153.** Rettinger G. Autogenous and allogenic cartilage transplants in head and neck surgery (excluding middle ear and trachea). *Eur Arch Otorhinolaryngol Suppl.* 1; (1992); 127-162.
- 154.** Ronga M., Grassi F.A., Manelli A., Bulgheroni P. Tissue engineering techniques for the treatment of a complex knee injury. *Arthroscopy.* 22; (2006); 576.e1-3.
- 155.** Rotter N. Untersuchungen zum in vivo Verhalten von in vitro gezüchteten vitalen Knorpeltransplantatmaterial. *Med. Diss. LMU. München* (1997)
- 156.** Rotter N., Aigner J., Naumann A., et al. Cartilage reconstruction in head and neck surgery: comparison of a resorbable polymer scaffolds for tissue engineering of human septal cartilage. *J Biomed Mater. Res.* 42; (1998); 347-356.
- 157.** Rotter N., Sittinger M., Hammer C., Bujia J., Kastenbauer E. Transplantation in vitro hergestellter Knorpelmaterialien: Charakterisierung der Matrix-Synthese. *Laryngo-Rhino-Otol.* 76; (1997); 241-247.
- 158.** Saadeh P.B., Brent B., Mehara B.J., et al. Human cartilage engineering: chondrocyte extraction, proliferation, and characterization for construct development. *Ann Plast Surg.* 42; (1999); 509-513.
- 159.** Sanger J.R., Matloub H.S., Gosain A.K., Yousif N.J. Scalp reconstruction with a prefabricated abdominal flap carried by the radical artery: case report. *Plast Reconstr Surg.* 89; (1992); 315-319.
- 160.** Sasaski G.H., Pang C.Y. Pathophysiology of the skin flaps raised on expanded pig skin. *Plast Reconstr Surg.* 74; (1984); 59-67.

- 161.** Schechter G.L., Biller H.F., Ogura J.H. Revascularized skin flaps: A new concept in transfer of skin flaps. *Laryngos.* 79; (1969); 1647-1665.
- 162.** Schuchardt K. Der Rundstiellappen in der Wiederherstellungschirurgie des Gesichts-Kieferbereiches. Georg Thieme, Verlag, Leipzig. (1944); 11-42.
- 163.** Schweinbeck S. Die Neovaskularisation im präformierten Gewebelappen unter Einfluss eines Gewebeexpanders - eine tierexperimentelle Studie am Kaninchen. *Vet Med Dissertation; München; (1999).*
- 164.** Shaw W.W., Hidalgo D.A. Anatomic basis of plantar flap design: Clinical applications. *Plast Reconstr Surg.* 78; (1986); 637-651.
- 165.** Shen T.Y. Vascular implantation into skin flap: experimental study and clinical application: a preliminary report. *Plast Reconstr Surg.* 68; (1981); 404-409.
- 166.** Shen T.Y. Experimental study of tissue graft vascularization by mean of vascular implantation and subcutaneous burying. *Plast Reconstr Surg.* 73; (1984); 403-410.
- 167.** Shin'oka T., Imai Y., Ikada Y. Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *N Engl J Med.* 344; (2001); 532-533.
- 168.** Silvermann R.P., Passeretti D., Huang W., Randolph M.A., Yaremchuck M.J. Injectable tissue-engineered cartilage using a fibrin glue polymer. *Plast Reconstr Surg.* 103; (1999); 1809-1818.
- 169.** Sims C.D., Butler P.E., Cao Y.L., et al. Tissue engineered neocartilage using plasma derived polymer substrates and chondrocytes. *Plast Reconstr Surg.* 101; (1998); 1580-1585.
- 170.** Sittinger M., Bujia J., Minuth W.W., Hammer C., Burmester G.R. Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture. *Biomat.* 15; (1994); 451-456.
- 171.** Solchaga L.A., Dennis J.E., Goldberg V.M., Caplan A.I. Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repair of bone and cartilage. *J Orthop Res.* 17; (1999); 205-213.
- 172.** Spitalny H.H., Lemperle G. Langzeiterfahrung mit Silikonimplantaten im Gesicht. *Handchir Mikrochir Plast Chir.* 14; (1982); 29-35.
- 173.** Staudenmaier R. Ohrmuschelrekonstruktion: Wandel der Technik – Möglichkeiten durch Rapid Prototyping und Tissue Engineering von Knorpelgewebe. *Habilitationsschrift an der Universität Regensburg.* (2005); 1-110.
- 174.** Staudenmaier R., Aigner J., Kastenbauer E. Mikrotie: Ohrrekonstruktion mit autologem Rippenknorpel. *Handchir Mikrochir Plast Chir.* 33; (2001); 162-170.

- 175.** Staudenmaier R., Naumann A., Brüning R., Englmeier K.H., Aigner J. Ear reconstruction supported by a stereolithographical model. *Plast Reconstr Surg.* 106; (2000b); 511-512.
- 176.** Staudenmaier R., Nguyen T. Hoang, Kleinsasser N., et al. Flap prefabrication and prelamination with tissue-engineered cartilage. *J Reconstr Microsurg.* 20; (2004); 555-564.
- 177.** Steiner A. Herstellung von individuellen Operationsschablonen, Epithesen und resorbierbaren Trägern für Tissue Engineering von Ohrmuschelformen mit Hilfe von Rapid Prototyping Verfahren. Dissertation; LMU München (2002).
- 178.** Stephan D., Valka J., Samohyl J., Smahel J. Prefabrication of a skin axial flap in experiment. *Acta Chir. Plast.* 35; (1993); 1-2.
- 179.** Suzuki F. Effects of various growth factors on a chondrocyte differentiation model. *Adv Exp Med Bio.* 324; (1992); 101- 106.
- 180.** Suzuki S., Isshiki N., Ogawa Y., Goto M., Hayashi O. The minimal requirement of circulation for survival of undelayed and delayed flaps in rats. *Plast Reconst Surg.* 78; (1986); 221-227.
- 181.** Takato T., Komuro Y., Yonehara H., Zuker R.M. Prefabricated venous flap: an experimental study in rabbits. *Br J Plast Surg.* 46; (1993); 122-123.
- 182.** Takato T., Zuker R.M., Turley C.B. Prefabrication of skin flaps using vein grafts: an experimental study in rabbits. *Br J Plast Surg.* 44; (1991); 593-598.
- 183.** Takato T., Zuker R.M., Turley C.B. Viability and versability of arterialized venous perfusion flaps and prefabricated flaps: an experimental study in rabbits. *J Reconstr Microsurg.* 8; (1992); 111-119.
- 184.** Tanaka Y., Sung K.C., Tsutsumi A., et al. Tissue Engineering Skin flaps: which vascular carrier, arteriovenous shunt loop or arteriovenous bundle, has more potential for angiogenesis and tissue generation?. *Plast Reconstr Surg.* 112; (2003); 1636-1644.
- 185.** Tark K.C., Shaw W.W. The revascularization interface in flap prefabrication: a quantitative and morphologic study of the relationship between carrier size and surviving area. *J Reconstr Microsurg.* 12; (1996); 325-330.
- 186.** Taylor G.I., Miller G.D.H., Ham F.J. The free vascularized bone graft. *Plast Reconst Surg.* 55; (1975); 533-537.
- 187.** ten Koppel P.G., van Osch G.J., Verwoerd C.D., Verwoerd-Verhoef H.L. Efficacy of perichondrium and a trabecular demineralized bone matrix for generating cartilage. *Plast Reconstr Surg.* 102; (1998); 2012-2020.
- 188.** Timmenga E.J.F., Schoorl R., Bos J.D., Klopper P.J. An improved model for tissue expansion and flap research in the rabbit. *Br J Plast Surg.* 42; (1989); 301-305.

- 189.** Ueda K., Harada T., Nagasaka S., Oba S., et al. An experimental study of delay of flow-through venous flaps. *Br J Plast Surg.* 46; (1993); 56-60.
- 190.** Upton J., Ferraro N., Healy G., Khouri R.G., Merrell C. The use of prefabricated facial flaps for lining of the oral and nasal cavities. *Plast Reconstr Surg.* 94; (1994); 573-579.
- 191.** Vacanti C.A. The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med.* 10; (2006); 569-576.
- 192.** Vacanti C.A., Langer R., Schloo B., Vacanti J.P. Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. *Plast. Reconstr. Surg.* 88; (1991); 753-759.
- 193.** Valauri F.A., Hirase Y., Buncke H.J. Prefabricated muscle flaps: pedicle variations. *J Reconstr Microsurg.* 4; (1988); 203-207.
- 194.** Van Osch G.J., Mandl E.W., Marijnissen W.J., et al. Growth factors in cartilage tissue engineering. *Biorheology.* 39; (2002); 215-220.
- 195.** Vereinigung der Deutschen Plastischen Chirurgen (VDPC). *Plastische Chirurgie: Peeling / Dermabrasion.* (2002); 2-15.
- 196.** Vivien D., Galera P., Lebrun E., Loyou G., Pujol J.P. Differential effects of transforming growth factor beta and epidermal growth factor on the cell cycle of cultured rabbit articular chondrocytes. *J Cell Physiol.* 143; (1990); 534-545.
- 197.** von der Mark K., Gauss V., von der Mark H., Muller P. Relationship between shape and type of collagen synthesized as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature.* 267; (1977); 531-532
- 198.** Voy E.-D. Zur Vaskularisation und Resorption unterschiedlicher Stützgewebe durch das Omentum majus bei der Bildung mikrovaskulär kombinierter Transplantate. *Handchirurg. Sonderheft;* 17; (1985); 63-65.
- 199.** Voy E.-D., Hettich R. Experimentelle Untersuchung zur Vaskularisation freier Transplantate durch das Omentum majus. *Dtsch. Z Mund-Kiefer Gesichts-Chirg.* 6; (1982); 34-38.
- 200.** Voy E.-D., Mayer H.-R., Hettich R. Experimentelle Untersuchungen zur Herstellung mikrovaskulärer, mehrschichtig - zusammengesetzter Transplantate mit Hilfe des Omentum majus. *Handchirurg.* 16; (1984); 157-160.
- 201.** Vunjak-Novakovic G., Obradovic B., Martin I., Freed L.E. Bioreactor studies of native and tissue engineered cartilage. *Biorheology.* 39; (2002); 259-268.
- 202.** Weber U., Greulich M., Sparmann M. *Orthopädische Mikrochirurgie.* Georg Thieme Verlag. Stuttgart, New York. (1993); 1-3.

- 203.** Werner J. Die Neovaskularisation durch isolierte Arterien und Venen als implantierter Gefäßstiel im präfabrizierten Hautlappen: experimentelle Untersuchungen am Kaninchen. Vet Med Dissertation München; (2000).
- 204.** Wilson Y.T., Kumta S., Hickey M.J., et al. Use of free interpositional vein grafts as pedicles for prefabrication of skin flaps. *Microsurg.* 15; (1994); 717-721.
- 205.** Winkel R., Noah E.M., Schramm U. Endothelial cells of implanted veins to neovascularize free muscle grafts in a rat model. *Eur J Plast Surg.* 18; (1995); 201-208.
- 206.** Yang G., Chen B., Gao Y., Liu X., Li J. Forearm free skin flap transplantation. *Natl Med J China.* 61; (1981); 139.
- 207.** Yap-Legaspi E.C., Nozaki M., Takeuchi M. The contribution of perivascular tissue to the neovascularization of full thickness skin grafts (prefabricated flaps): an experimental study. *Br J Plast Surg.* 48; (1995); 89-92.
- 208.** Zhang L., Michaelles B.M., Bakshandeh N., et al. Prefabricated flap size limitations utilizing an omental carrier. *Microsurg.* 15; (1994); 568-570.
- 209.** Zhou Z., Nichter L.S., West B.R., Navarrette P.M. Evaluation of a temporary arteriovenous shunt to establish neovascularization in a musculocutaneous flap: an experimental study. *Microsurg.* 15; (1994); 63-69.

9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1: Aufbau der Haut (nach der Vereinigung der Deutschen Plastischen Chirurgen; 2002)
- Abb. 2: Drei Schichten der Haut und Blutversorgung (Vereinigung der Deutschen Plastischen Chirurgen; 2002).
- Abb. 3: Vier Gruppen der Blutversorgung der Haut nach McCarthy (1990)
- Abb. 4: Verschiebehautlappen (A) und Raupenlappen (B) nach Burian [1978].
- Abb. 5: Rotationslappen (nach Kaufmann, 1987)
- Abb. 6: Transpositions-lappen (nach Kaufmann, 1987).
- Abb. 7: Plantaris medialis Insellappen
- Abb. 8: Italienischer Lappen am Oberschenkel (Burian 1978)
- Abb. 9: Rundstiellappen zur Unterschenkelrekonstruktion (F.Burian 1978)
- Abb. 10: Rekonstruktion eines ausgedehnten Hautweichteildefektes mit offener Tibia-Fraktur am Unterschenkel durch einen freien mikrochirurgischen VRAM-Lappen: Lappendesign (1); Nach der Abpräparation (2); präoperative Bilder (3) und 12-Monate postoperative Ergebnisse (4).
- Abb. 11: Ungünstige Ergebnisse nach freier Lappentransplantation: (1 und 2) Lappen war zu dick und plump; (3 und 4) Ausgeprägte Spendermorbidity.
- Abb. 12: Schwierige Herausforderungen für die chirurgische Rekonstruktion: Ausgedehnter Gewebsverlust des gesamten posterioren Unterschenkels (1); Angeborene Ohrmalformation (2).
- Abb. 13: Anatomische Darstellung der A. V. femoralis und saphena magna (1, 2) beim Kaninchen, und Präparation des Bauchhautlappens mit Silikonfolie (3) und Gefäßsystem (4) beim Kaninchen.
- Abb. 14: Schematische Darstellung des Modells 1 (Ligatur): Das Gefäßstielende wurde einfach ligiert und unter dem Bauchhautlappen fixiert.
- Abb. 15: Schematische Darstellung des Modells 2 (Anastomose): Arteria und Vena saphena magna des distalen Gefäßstielendes wurden end-zu-end anastomosiert und unter dem Bauchhautlappen fixiert.

- Abb.16: Schematische Darstellung des Modells 3 (venöse Schlinge): (1) Lappendesign; (2) Herstellung einer isolierten arterialisierten venösen Gefäßschlinge; (3) Gefäßschlinge wurde unter dem Bauchhautlappen fixiert; (4) Verschluss aller Hautinzisionen.
- Abb.17: Schematische Darstellung des Modells 4 (arterielle Schlinge): (1) Lappendesign; (2) Herstellung einer isolierten arteriellen Gefäßschlinge; (3) Gefäßschlinge wurde unter dem Bauchhautlappen fixiert; (4) Verschluss aller Hautinzisionen.
- Abb.18: Schematische Darstellung des Modells 5 (Expander) beim Kaninchen: Im Modell 5 wurde der arterio-venöse Gefäßstiel mit maximalem Blutfluss in Kombination mit einem 8 x 14 cm großer Gewebeexpander (Füllungsvolumen von 250 ml) gestaltet.
- Abb.19A: Methode zur quantitativen Auswertung der Neovaskularisation im Lappen (1) beim arterio-venösen Gefäßstiel; (2) bei der Gefäßschlinge.
- Abb.19B: Schnittebene der histologischen Präparate (1): Proximaler Schnitt des Gefäßstiels; (2): Mittlerer Schnitt des Gefäßstiels; (3): Distaler Schnitt des Gefäßstiels; (4): Distaler Schnitt des Lappens (ohne Gefäßstiel).
- Abb.20: In vitro Versuchablauf :1. Knorpelprobe aus dem Ohr (2 x 2 cm). Elektronenmikroskopische Aufnahme von Polycaprolacton in Form eines porösen Trägers. In vitro Herstellung von gezüchteten Knorpelzellen-Konstrukten
- Abb.21: Schematische Darstellung des in vivo Versuchsablaufs: (1) Implantation des arteriovenösen Gefäßstiels mit endständiger Anastomose; (2) Implantation von gezüchteten Knorpelzell-Biomaterialkonstrukten und Kontrolle ohne Zellen im Lappen.
- Abb.22: Makroskopische Aufsicht der Lappenvitalität nach 20 Tagen p.o. 1: Modell 1 (Ligatur) und Modell 2 (Anastomose); 2. Modell 5 (Expander).
- Abb.23: Darstellung der Kapselneubildung an der Unterseite des Lappens. (1 und 2): In vivo makroskopische Beurteilung des Modells 2 nach 8 Tage p.o.; (3 und 4): Schematische Illustration von intra- und postoperativem Situs.
- Abb. 24: Vitalität des präfabrizierten Bauchhautlappens: (1) Lappenumschneidung, (2) Hebung als Insellappen, (3) in situ Rückverlagerung (4) normale

Wundheilung mit unauffälliger Farbe und Haarwachstum auf dem Hautlappen im Verlauf.

- Abb. 25: Die Anreicherung der Th-201 Szintigraphie, 3 min. nach Infusion des Radiopharmakons in vivo in den Untersuchungszeiträumen 4, 8, 12, 16 und 20 Tage [rechtes Abdomen: Modell 1 (Ligatur); linkes Abdomen: Modell 2 (Anastomose)].
- Abb. 26: Die Anreicherung der Th-201 Szintigraphie, 30 min. nach Infusion des Radiopharmakons in vivo in den Untersuchungszeiträumen 4, 8, 12, 16 und 20 Tage [rechtes Abdomen: Modell 1 (Ligatur); linkes Abdomen: Modell 2 (Anastomose)].
- Abb.27: Szintigraphische Darstellung, Anflutungs- und Retentionsphase der Th-201 Szintigraphie im Lappen durch die relative Kurvenhöhe (rH) zum Zeitpunkt 4, 8, 12, 16 und 20 Minuten.
- Abb. 28: Szintigraphische Darstellung, Anreicherung der Th-201 Szintigraphie im Lappen 32 Minuten nach Infusion der Aktivität (norm. Area. pix. 32 min. p.i) in den Beobachtungszeiträumen 4, 8, 12, 16 und 20 Tagen.
- Abb. 29: Graphische Darstellung der Neovaskularisation im präfabrizierten Hautlappen nach Gefäßstielimplantation in den Beobachtungszeiträumen von 4, 8, 12, 16 und 20 Tagen bei verschiedenen Modellvarianten im Vergleich zur Kontrollgruppe.
- Abb. 30: Selektive Mikroangiographie der Gruppe 4-Tage für alle Modellvarianten im Vergleich mit der Kontrollgruppe.
- Abb. 31: Selektive Mikroangiographie der Gruppe 8-Tage für alle Modellvarianten im Vergleich mit der Kontrollgruppe.
- Abb. 32: Selektive Mikroangiographie der Gruppe 12-Tage für alle Modellvarianten im Vergleich mit der Kontrollgruppe.
- Abb. 33: Selektive Mikroangiographie der Gruppe 16-Tage für alle Modellvarianten im Vergleich mit der Kontrollgruppe.
- Abb. 34: Selektive Mikroangiographie der Gruppe 20-Tage für alle Modellvarianten im Vergleich mit der Kontrollgruppe.
- Abb. 35: Histologie der Gruppe 4-Tage von allen Modellen.
- Abb. 36: Histologie der Gruppe 8-Tage von allen Modellen.

- Abb. 37: Histologie der Gruppe 12-Tage von allen Modellen.
- Abb. 38: Histologie der Gruppe 16-Tage von allen Modellen.
- Abb. 39: Histologie der Gruppe 20-Tage von allen Modellen.
- Abb. 40: Elektronenmikroskopie der Leitschiene (1) und Vitalfärbung (vitale Zelle: grün, tote Zellen: rot) nach der Besiedelung des Polycaprolactons (2).
- Abb. 41: Makroskopische Aufsicht an der Unterseite des präfabrizierten Lappens mit den Konstrukten (6 Wochen p.o.).
- Abb. 42: Vitalität des präfabrizierten Bauchhautlappens in Kombination mit gezüchtetem Knorpelzell-Konstrukt (PL+KK) nach der freien mikrochirurgischen Transplantation. (1) PL +KK 6 Wochen p.o.; (2) Lappenaufhebung als ein freier Hautlappen; (3) Nach dem mikrochirurgischen Gefäßanschluss wurde der Hautlappen in situ zurückgenäht; (4) unauffällige Vitalität des Lappens 2 Wochen nach der freien Lappentransplantation.
- Abb. 43: Selektive Mikroangiographie des präfabrizierten Bauchhautlappens mit Konstrukten (6 Wochen p.o.).
- Abb. 44: Histologische Darstellung des Kontrollträgers (HE-Färbung, 5x, Schnittebene 4): (1) Präfabrizierter Lappen (P.L) und poröse Konstrukt (P.K) miteinander stabil verbunden; (2, 3, 4). Gute Neovaskularisierung und kräftige Infiltration von Fibroblasten im Konstrukt ohne Hinweise auf Knorpelwachstum bei allen Präparaten.
- Abb. 45: Histologische Darstellung des gezüchteten Knorpelzell-Konstruktes (HE-Färbung, Schnittebene 3): (1) Präfabrizierter Lappen und poröses Konstrukt miteinander stabil verbunden (5x); (2) Gute Neovaskularisierung im Biokonstrukt aus Caprolactone (5x); (3, 4) Knorpelähnliche Zellen zeigten sich als ein Hinweis auf das Knorpelwachstum in porösen Konstrukten 6 Wochen p.o (20x und 60x Vergrößerung).
- Abb. 46: Darstellung extrazellulärer Matrix (ECM) mit der Alcian-Färbung als Nachweis des Knorpelwachstums (blau) nach der Implantation von gezüchteten Knorpelzell-Konstrukten im präfabrizierten Bauchhautlappen (15x und 60x Vergrößerung).

Abb. 47:

- 47.1a – 47.1c: Präoperative Ansicht des ausgedehnten vernarbten Hautweichteildefekts am Hinterfuß mit Unterschenkelverkürzung von 8 cm und die präoperative Röntgenaufnahmen.
- 47.2a – 47.2e: Präoperatives Design eines präfabrizierten Hautlappens an der Leistenregion unter Verwendung der isolierten arterialisierten venösen Gefäßschlinge aus der Vena saphena magna (2a-2b); Die Präparation und Hebung der isolierten Vena saphena magna (2c); Herstellung einer arterialisierten venösen Gefäßschlinge durch die mikrochirurgische Anastomose am Leistenband zwischen der distalen Gefäßende der Vena saphena magna und dem Gefäßstumpf der A. circumflexa femoris lateralis in einer End-zu-End Einzelknopftechnik (2d); die Implantation der hergestellten venösen Gefäßschlinge an der Unterseite eines Hautlappens am Leistenband zur Lappenpräfabrikation (2e).
- 47.3a – 47.3d: Lappenhebung als Insellappen unter Erhalt des implantierten Gefäßstiels (3a-3b); in situ Zurücknaht nach der Lappenhebung (3c); unauffällige Hautlappenvitalität mit physiologischer postoperativer Wundrandheilung nach der Lappenhebung (3d).
- 47.4a – 47.4e: Ergebnisse nach der Hautlappenrekonstruktion und Unterschenkelverlängerung von 8 cm (4a - 4c); Minimale Morbidität an der Spenderstelle durch den primären Wundverschluss und die gute Versteckungsmöglichkeit des Narbenareales (4d - 4e).
- 47.5a – 47.5c: in vivo selektive Angiographie: 1 Woche nach der Herstellung (5a); 4 Wochen nach der Herstellung (5b); 2 Monate nach der freien Transplantation (5c).

10. TABELLENVERZEICHNIS

- Tab. 1. Übersicht über operierte Versuchstiere und Versuchsrippen in der Studie I
- Tab. 2. Größe des aktivitätstragenden Gewebes 3 min p.i. und Parameter der Zeitaktivitätskurve beim Modell 1 (A.V. Ligatur) in Abhängigkeit von der Zeit nach Gefäßstielimplantation.
- Tab. 3. Größe des aktivitätstragenden Gewebes 3 min p.i. und Parameter der Zeitaktivitätskurve beim Modell 2 (A.V. Anastomose) in Abhängigkeit von der Zeit nach Gefäßstielimplantation.
- Tab. 4. Größe des aktivitätstragenden Gewebes 3 Minuten p.i. und Parameter der Zeitaktivitätskurve beim Modell 5 (Expander) in Abhängigkeit von der Zeit nach Gefäßstielimplantation.
- Tab. 5. Mittelwerte und Prozente der ausgezählten Gefäße bei allen untersuchten Modellen nach den verschiedenen Verweilzeiten des implantierten Gefäßstieles von 4, 8, 12, 16 und 20 Tage im Vergleich mit der Kontrollgruppe (100%).
- Tab. 6. Standardabweichungen und Prozente der ausgezählten Gefäße
- Tab. 7. Mittelwerte der Anzahl Mikropaque gefüllter Gefäße im präfabrizierten Lappen in Kombination mit gezüchteten Knorpelzellen-Konstrukten.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.:	Arterie	MCH:	Mean Corpuscular Hemoglobin
Abb.:	Abbildung	MCHC:	Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration
Anas.:	Anastomose	MCV:	Mean Cell Volume
Aqua. dest.	Destilliertes Wasser	mg:	Milligramm
bzgl.	Bezüglich	MID:	Monozyten, Eosinophile, Basophile, Granulozyten und Vorstufen
°C:	Grad Celsius	min.:	Minuten
cm:	Zentimeter	ml.:	Milliliter
cm ² :	Quadratzentimeter	mm:	Millimeter
cm ³ :	Kubikzentimeter	µm:	Mikrometer
CO ₂ :	Kohlendioxid	NaCl:	Natriumchlorid
EGF:	Epidermal Growth Factor	NAHCO ³ -:	Natriumbikarbonat
FCS:	Fetal Calf Serum	PaCO ₂ :	arterieller Kohlendioxid-Partialdruck
FGF:	Fibroblast Growth Factor	PaO ₂ :	arterieller Sauerstoff - Partialdruck
ggf.:	gegebenenfalls	PDGF:	Platelet Derived Growth Factor
Gr.:	Gramm	pH:	pH - Wert
GRAN:	Granulozyten	P.L.:	Präfabrizierte Hautlappen
h:	Stunde	p.o.:	postoperativ
HCO ₃ :	aktuelles Bicarbonat	RBC:	Red Blood Cells (Erythrozyten)
HCT:	Hämatokrit	ROI:	Region of Interest
HGB:	Hämoglobin	Rpm:	Rounds per minute
HE:	Hämatoxilin - Eosin	RZ:	Rundzellen
H ₂ O:	Wasser	Tab.:	Tabelle
I.E.	Internationale Einheiten	TGF:	Transforming Growth Factor
i.c.:	intrakutan	T.E.:	Tissue Engineering
IGF:	Insulin-like Growth Factor	TRAM:	Transverse Rectus Abdominis Muscle flap
i.m.:	intramuskulär	u.a.	unter anderem
i.v.:	intravenös	V.	Vene
KG:	Körpergewicht	WBC:	White Blood Cells (Leukozyten)
kg:	Kilogramm		
L:	Liter		
Lymph.:	Lymphozyten		

DANKSAGUNG

Die Fertigstellung dieser Habilitationsschrift war nur möglich durch die finanzielle Hilfe und Unterstützung der **Alexander von Humboldt-Stiftung, DAAD** (Deutscher Akademischer Austauschdienst) und der **DFG** (Deutsche Forschungsgemeinschaft). Diese Arbeit bedeutet einen sehr wichtigen Schritt in meinem wissenschaftlichen Leben. Darum möchte ich mich zu allererst bei der AvH-Stiftung, dem DAAD und der DFG ganz besonders herzlich bedanken.

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Univ. Prof. Dr. med. **R. Gradinger**, Direktor der Orthopädischen und Sportorthopädischen Klinik und Poliklinik am Klinikum rechts der Isar der TU München, Vorsitzender des Fachmentorats für die erfolgreiche wissenschaftliche Betreuung, wertvolle Hilfestellung und Unterstützung für die Anfertigung dieser Arbeit ganz besonders herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. **B. Gänsbacher**, Direktor des Institutes für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung am Klinikum rechts der Isar der TU München danke ich recht herzlich für die freundliche Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die hilfreiche wissenschaftliche Unterstützung.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Univ. Prof. Dr. med. **H. Bier**, Direktor der HNO-Klinik und Poliklinik, Herrn Univ. Prof. Dr. med. **H.G. Machens**, Direktor der Klinik und Poliklinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie, Herrn Univ. Prof. Dr. med. **E. Biemer**, ehemaliger Vorstand der Abteilung für Plastische Chirurgie am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, Herrn Univ. Prof. Dr. med. **J. Strutz**, Direktor der HNO-Klinik und Poliklinik am Univ.-Klinikum Regensburg, für die Überlassung des Themas, des Arbeitsplatzes, ihre ideenreiche Hilfe und ihre stets gewährte, großzügige Unterstützung recht herzlich bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem wissenschaftlichen Betreuer, Herrn PD. Dr. med. **R. Staudenmaier**, leitender Oberarzt der HNO-Klinik und Poliklinik am Klinikum rechts der Isar der TU München, der mit steter ideenreicher Diskussionsbereitschaft, stets gewährter Hilfe und freundschaftlichem kritischen Ansporn beigetragen hat. Ohne seine wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung wäre diese Habilitationsarbeit sicherlich unmöglich gewesen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD. Dr. med. **C. Höhnke**, Klinik und Poliklinik für Plastische und Handchirurgie am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München für die wissenschaftliche Betreuung, wertvolle Hilfsbereitschaft, freundliche und geduldige Unterstützung, die ganz wesentlich zur Anfertigung dieser Arbeit waren.

Ich bedanke mich recht herzlich bei Herrn Dr. med. **M. Klöppel**, Abteilung für Plastische und Wiederherstellungschirurgie am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München für die wissenschaftliche ausgezeichnete Zusammenarbeit und ideenreiche Hilfe, die sehr wichtig zum Gelingen dieser Arbeit war.

Herrn Dr. med. vet. **J. Werner**, Fr. Dr. med. vet. **S. Schweinbeck** und der Doktorandin **Pham T.T.H.** danke ich für ihre fleißige, geduldige und erfolgreiche Zusammenarbeit am Projekt. Für ihre weiteren Arbeiten wünsche ich ihnen viel Erfolg.

Frau **Rosa Hörmann**, Sekretariat der HNO-Klinik und Poliklinik am Klinikum rechts der Isar, danke ich besonders für ihre freundliche Geduld und Gründlichkeit bei der Korrektur meiner Orthographie sowie grammatikalischen Fehler.

Ebenso möchte ich Herrn Univ. Prof. Dr. med. vet. **W. Erhardt**, Fr. Dr. med. .vet. **J. Henkel**, Dr. med. **T. Brill**, den **OP-Schwestern** und allen **Tierpflegern** des Instituts für experimentelle Onkologie und Therapieforschung am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, für die Anästhesie, Bereitstellung der Labor- und Operationsräume sowie nötigen Arbeitsmaterialien danken.

Darüber hinaus gilt mein herzlicher Dank Fr. Dr. **M. Wenzel**, Herrn Dr. med. **C. Laubenbacher** OA der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik der TUM, Herrn PD. Dr. med. **O. Petrowicz** und Fr. Dr. med. vet. **K. Herfeldt** des Instituts für experimentelle Onkologie und Therapieforschung der TUM, für die erfolgreiche wissenschaftliche Zusammenarbeit, Herstellung der szintigraphischen, histologischen Aufnahmen und Statistischen Analysen sowie ihre stets freundliche Hilfe bei den Auswertungen.

An diese Stelle möchte ich mich bei meinen **Eltern**, meiner **Frau** und meiner **Familie** ganz besonders herzlich bedanken, die viel Verständnis und Begeisterung für meine Berufsausbildung und die Fertigstellung dieser Habilitationsschrift mitgebracht haben.

Auch Herrn Univ. Prof. Dr. med. **Nguyen van Nhan**, Univ. Prof. Dr. med. **Nguyen Huy Phan**, Priv. Doz. Dr. med. **Nguyen Bac Hung**, Dr. med. **Dinh Ngoc Duy**, Priv. Doz. Dr. med. **Nguyen Hong Giang** und allen **Mitarbeitern** am Institut für Unfall-Orthopädie und Plastische Chirurgie des zentralen Univ.-Klinikums 108, TRAN HUNG DAO, HANOI - VIETNAM schulde ich ein herzliches Dankeschön für ihre großzügige und freundliche Hilfe besonders bei meiner chirurgischen und mikrochirurgischen Fachausbildung.

LEBENS LAUF



Persönliche Daten

Name und Vorname: Nguyen The Hoang

Adresse: 163 Hoa bang - Cau giay - Hanoi - Vietnam.

Geboren: 01. 8. 1965 in Nghe Tinh - Vietnam.

Familienstand: verheiratet

Gegenwärtige Arbeitsstelle: Vorstand der Abteilung für Mikrochirurgie und Handchirurgie (B1-2), Institut für Unfallchirurgie und Orthopädie am zentralen Universitätsklinikum 108, Nr. 1 - Tran Hung Dao, Hanoi, Vietnam.

Dienstadresse: Khoa B1-2, Vien Chan Thuong Chinh Hinh, Benh Vien 108, So 1 - Tran Hung Dao, Hanoi, Vietnam.

(E-mail adresse: hoangkolpinghaus1@yahoo.com)

Staatsangehörigkeit: Vietnamesische.

Werdegang

1970 – 1974: Grundschule Kim Lien.

1974 – 1977: Mittelschule Nguyen Du.

1978 – 1981: Oberschule Ly Thuong Kiet ([Abschluß 6/81: Abitur](#)).

1981 – 1987: Humanmedizinisches Studium an der Militärmedizinischen Universität Hanoi-Vietnam.

07/ 1987: [Medizinstudiumsabschluss](#).

8/1987 – 5/1989: Arzt im Praktikum/Assistenzarzt am Klinikum 175 der Stadt Ho Chi Minh.

6/1989 – 8/1994: Assistenzarzt an der Abteilung für Unfall-, Orthopädische und Plastische Chirurgie am zentralen Univ.-Klinikum 108, Nr.1 - Tran Hung Dao - Hanoi - Vietnam.

08/ 1994: [Facharzt für Allgemein Chirurgie](#).

9/1994 – 6/1997: DAAD-Stipendiat und Doktorand an der Abteilung für Plastische Chirurgie (Vorstand: Univ. Prof. Dr. E. Biemer), Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München.

07/ 1997: [Promotion an der TU München](#).

- 8/1997 – 5/1999: Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Abteilung für Plastische Chirurgie (bei Herrn Prof. Dr. E. Biemer, Klinikum rechts der Isar der TUM).
- 7/1999 - 9/2003: **Oberarzt** an der Abteilung für Unfall-, Orthopädische und Plastische Chirurgie am zentralen Univ.-Klinikum 108, Nr. 1 - Tran Hung Dao, Hanoi, Vietnam.
- 10/ 2003 – 3/2004: Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Universitätsklinikum Regensburg gefördert durch Bayerisches Forschungsstipendium (im Rahmen des Forschungsprojektes: Präfabrizierte Gewebelappen in Verbindung mit Tissue Engineering von Knorpelgewebe).
- 4/2004 – 5/2005: **Leitender Oberarzt** der Abteilung für Mikrochirurgie und Handchirurgie des Instituts für Orthopädie, Traumatologie und Plastische Chirurgie am zentralen Univ.-Klinikum 108, Nr.1 - Tran Hung Dao, Hanoi, Vietnam.
- Seit 6/2005 - : **Vorstand** der Abteilung für Mikrochirurgie und Handchirurgie des Instituts für Orthopädie, Traumatologie und Plastische Chirurgie am zentralen Univ.-Klinikum 108, Nr.1 - Tran Hung Dao, Hanoi, Vietnam.
- Seit 1/2007: **AvH-Forschungsstipendiat** am Universitätsklinikum rechts der Isar der Technischen Universität München (im Rahmen des Forschungsprojektes: Präfabrizierte Gewebelappen und Tissue Engineering).