

Aus der Klinik und Poliklinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie
Klinikum Rechts der Isar der Technischen Universität München
Direktor: Prof. Dr. Hans-Günther Machens

**PRÄ- UND POSTKONDITIONIERUNG VON ISCHÄMISCHEM HAUT- UND
MUSKELGEWEBE MIT ERYTHROPOETIN**

Andrea Alessandra Weinzierl

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

Doktor der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Yves Harder
2. Prof. Dr. Kilian Eyerich, Ph.D.

Die Dissertation wurde am 14.08.2019 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.02.2020 angenommen.

Gewidmet meiner Familie und meinen Freunden

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|-----------|
| 1. Zusammenfassung | 1 |
| 2. Einleitung | 3 |
| 2.1 <i>Definition und Einteilung von Gewebelappen</i> | 3 |
| 2.2 <i>Die Geschichte der Lappenplastik</i> | 4 |
| 2.3 <i>Molekulare Mechanismen und Folgen von Gewebeischämie</i> | 5 |
| 2.4 <i>Strategien zur Verhinderung Ischämie-bedingter Komplikationen</i> | 7 |
| 2.5 <i>Erythropoetin</i> | 9 |
| 2.6 <i>Erkenntnisse aus Vorarbeiten</i> | 10 |
| 2.7 <i>Zielsetzung der Studie</i> | 11 |
| 3. Material und Methoden | 13 |
| 3.1 <i>Tiere</i> | 13 |
| 3.2 <i>Narkose</i> | 13 |
| 3.3 <i>Rückenhautkammer</i> | 14 |
| 3.4 <i>Postoperative Versorgung der Tiere</i> | 20 |
| 3.5 <i>EPO-Regime</i> | 21 |
| 3.6 <i>Intravitalmikroskopie</i> | 22 |
| 3.6.1 <i>Mikroskop</i> | 22 |
| 3.6.2 <i>Farbstoffe</i> | 23 |
| 3.6.3 <i>Mikroskopie-Protokoll</i> | 24 |
| 3.6.4 <i>Analyseverfahren</i> | 26 |
| 3.7 <i>Analyse der Blutproben</i> | 28 |
| 3.8 <i>Euthanasie und Explantation der Kammer</i> | 28 |
| 3.9 <i>Immunhistologische Analyse der Gewebeproben</i> | 29 |
| 3.10 <i>Statistische Analyse</i> | 30 |
| 4. Ergebnisse | 32 |
| 4.1 <i>Perfusionsausfall und Nekrose</i> | 32 |
| 4.2 <i>Hämatokrit</i> | 33 |
| 4.3 <i>Gefäßdurchmesser</i> | 34 |
| 4.3.1 <i>Arterieller Gefäßdurchmesser</i> | 34 |
| 4.3.2 <i>Venöser Gefäßdurchmesser</i> | 36 |
| 4.3.3 <i>Kapillärer Gefäßdurchmesser</i> | 37 |
| 4.4 <i>Fließgeschwindigkeit</i> | 38 |

| | |
|--|-----------|
| 4.4.1 Arterielle Fließgeschwindigkeit | 38 |
| 4.4.2 Venöse Fließgeschwindigkeit | 39 |
| 4.4.3 Kapilläre Fließgeschwindigkeit | 40 |
| 4.5 <i>Blutfluss</i> | 41 |
| 4.5.1 Arterieller Blutfluss | 41 |
| 4.5.2 Venöser Blutfluss | 43 |
| 4.5.3 Kapillärer Blutfluss | 44 |
| 4.6 <i>Funktionelle Kapillardichte</i> | 45 |
| 4.7 <i>Kapilläre Tortuosität</i> | 47 |
| 4.8 <i>Neoangiogenese</i> | 48 |
| 4.9 <i>Leukozyten</i> | 48 |
| 4.10 <i>Apoptose</i> | 49 |
| 4.11 <i>Histologie</i> | 50 |
| 4.11.1 eNOS | 50 |
| 4.11.2 VEGF | 51 |
| 5. Diskussion | 53 |
| 5.1 <i>Nekrose</i> | 54 |
| 5.2 <i>Hämatokrit</i> | 55 |
| 5.3 <i>Arterielle Perfusion</i> | 57 |
| 5.4 <i>Kapilläre Perfusion</i> | 59 |
| 5.5 <i>Neoangiogenese</i> | 60 |
| 5.6 <i>Inflammation</i> | 62 |
| 5.7 <i>Apoptose</i> | 63 |
| 6. Schlussfolgerung | 64 |
| 7. Abkürzungsverzeichnis | 66 |
| 8. Literaturverzeichnis | 68 |
| 9. Danksagung | 80 |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Rückenhautkammer mit Instrumentarium (Harder et al., 2014) | 15 |
| Abbildung 2: Lappenhebung und Kammerpräparation (Harder et al., 2014) | 19 |
| Abbildung 3: Übersichtsaufnahmen | 25 |
| Abbildung 4: Gefäßbündel (FITC, Rhodamin), Kapillarfeld, Apoptosen | 26 |
| Abbildung 5: Perfusionsausfall/Nekroserate | 33 |
| Abbildung 6: Hämatokrit | 34 |
| Abbildung 7: Arterieller Gefäßdurchmesser | 35 |
| Abbildung 8: Venöser Gefäßdurchmesser | 36 |
| Abbildung 9: Kapillärer Gefäßdurchmesser | 37 |
| Abbildung 10: Arterielle Fließgeschwindigkeit | 39 |
| Abbildung 11: Venöse Fließgeschwindigkeit | 40 |
| Abbildung 12: Kapilläre Fließgeschwindigkeit | 41 |
| Abbildung 13: Arterieller Blutfluss | 42 |
| Abbildung 14: Venöser Blutfluss | 44 |
| Abbildung 15: Kapillärer Blutfluss | 45 |
| Abbildung 16: Funktionelle Kapillardichte | 46 |
| Abbildung 17: Tortuositätsindex | 47 |
| Abbildung 18: Neoangiogenese | 48 |
| Abbildung 19: Apoptose | 50 |
| Abbildung 20: Immunhistologie eNOS | 51 |
| Abbildung 21: Immunhistologie VEGF | 52 |

1. Zusammenfassung

Hintergrund: Strategien zu Verhinderung ischämisch bedingter Gewebekomplikationen haben einen hohen Stellenwert in der experimentellen plastisch-chirurgischen Forschung. Es ist bekannt, dass Erythropoetin (EPO) nicht nur der primäre Regulator der Erythropoese ist, sondern auch gewebeprotective Eigenschaften besitzt. Ziel unserer Arbeit war es zwei EPO-Injektionsschemata zu evaluieren. Zum einen die konstante Verabreichung niedriger Dosen, zum anderen eine Verabreichung initial hoher Dosen mit einer raschen Reduktion auf niedrige Erhaltungsdosen.

Material & Methoden: Drei Gruppen zu je sechs C57Bl/6-Mäusen wurden untersucht. Auf dem Rücken jedes Tieres wurde ein randomisiert perfundierter Haut-Muskel-Lappen gehoben und in eine Rückenhautkammer eingebracht. Die Gruppen wurden wie folgt behandelt: 1. Prä- und Postkonditionierung mit niedrigen Dosen EPO (EPO-low); 2. Prä- und Postkonditionierung mit initial hohen Dosen EPO und nachfolgend niedrigen Dosen (EPO-high); 3. Unbehandelte Kontrollgruppe (CON). An den Tagen 1, 3, 5, 7 und 10 nach der Lappenhebung wurden die Lappen mittels intravital Epi-Fluoreszenzmikroskopie untersucht und das Ausmaß der Lappennekrose, sowie die Mikrozirkulation und Angiogenese beurteilt. Zusätzlich wurde wiederholt der Hämatokrit gemessen und das Lappengewebe immunhistologisch beurteilt.

Ergebnisse: In der EPO-Low Gruppe konnte die Nekroserate im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verringert werden. Dies war mit einer arteriellen Gefäßdilatation, einem Anstieg der arteriellen Fließgeschwindigkeit und dementsprechend einem signifikant höheren arteriellen Blutfluss

vergesellschaftet. In der EPO-Low Gruppe konnte des Weiteren in den kritisch durchbluteten Lappenarealen eine signifikant höhere funktionelle Kapillardichte erhalten werden. Die Verwendung initial hoher Dosen EPO in der EPO-High Gruppe führte zu keiner signifikanten Reduktion der Lappennekrose im Vergleich zur Kontrollgruppe. EPO-induzierte Angiogenese konnte in Tieren beider Behandlungsgruppen beobachtet werden. Ein signifikanter Hämatokritanstieg konnte nur in der EPO-High Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden.

Schlussfolgerung: Die Prä- und Postkonditionierung mit konstant niedrigen Dosierungen EPO verringert die Gewebenekrose signifikant und ist als Folge einer verbesserten arteriellen Durchblutung und somit einer Aufrechterhaltung der nutritiven Kapillarperfusion zu sehen. Die initiale Gabe von hohen EPO-Dosierungen zeigte keine Gewebeprotektion. Die Prä- und Postkonditionierung mit Hämatokrit-irrelevanten EPO-Dosierungen stellen somit einen viel versprechenden therapeutischen Ansatz zur Verringerung ischämisch bedingter Komplikationen in der klinischen Lappenchirurgie dar.

2. Einleitung

2.1 Definition und Einteilung von Gewebelappen

Der Begriff Lappenplastik beschreibt verschiedene Operationstechniken der plastischen bzw. rekonstruktiven Chirurgie zur Beseitigung von Gewebedefekten oder -defiziten. Hierbei werden definierte Gewebeabschnitte mobilisiert bzw. entnommen und in eine andere Körperregion übertragen. Neben der Rekonstruktion der Funktion (z.B. bei Gewebedefekten), ist auch die Rekonstruktion der Form (z.B. nach Ablation der weiblichen Brust) eine wichtige Indikation für Lappenplastiken.

Gewelappen können nach verschiedenen Gesichtspunkten eingeteilt werden. So können sie bezüglich ihrer Durchblutung in randomisiert perfundierte Lappen (ohne definierte Gefäßversorgung) und axial perfundierte Lappen (mit definierter Gefäßversorgung) unterteilt werden. Wird der Lappen randomisiert, also ohne zugehöriges versorgendes Gefäß gehoben, so erfolgt die Durchblutung von der Lappenbasis aus über den subdermalen Gefäßplexus. Das Verhältnis von Länge und Breite des Lappens muss hierbei so gewählt werden, dass die Lappenbasis breit genug ist, um eine adäquate Blutversorgung der Lappenperipherie zu gewährleisten.

Des Weiteren ist die Unterteilung der Lappenplastiken bezüglich ihrer Entnahmestelle in lokale, regionale und Fernlappenplastiken möglich. Wird bei der Fernlappenplastik die bestehende Versorgung mit Blutgefäßen und Nerven erhalten, spricht man von einem gestielten Lappen, wohingegen bei einem Neuanschluss der Blutgefäße an die Blutversorgung der neuen Umgebung von einer freien Lappenplastik gesprochen wird.

Es ist ebenfalls möglich Lappen nach der enthaltenen Gewebezusammensetzung zu unterteilen (z.B. kutane, fasziokutane,

myofasziokutane oder osteokutane Lappen). Die Auswahl der Gewebezusammensetzung hängt hierbei von dem zu deckenden Defekt und dessen Lokalisation, Tiefe, Durchblutungssituation und weiteren individuell verschiedenen Faktoren ab. Generell wird versucht, Gleiches mit Gleichem zu ersetzen, also das Ersatzgewebe möglichst dem zu deckenden Defekt anzupassen (Janis et al., 2011) und eine personalisierte und individuelle Lösung zu finden, die für den Patienten sowohl funktionell als auch ästhetisch zufriedenstellend ist.

2.2 Die Geschichte der Lappenplastik

Der Ersatz von zerstörtem Gewebe und die Wiederherstellung der natürlichen anatomischen Verhältnisse ist ein Problem, welches Ärzte schon seit Jahrhunderten beschäftigt. In Indien im Jahr 600 vor Christus, lange bevor es Anästhesien oder Antibiotika gab, beschrieb Sushruta Samita bereits Operationsverfahren zu Wiederherstellung der Nase mit einem Stirnlappen, da das Abtrennen der Nase damals als eine angemessene Bestrafung für das Begehen von Verbrechen galt (Champaneria et al., 2014).

Mit der Zeit wurden immer komplexere Gewebelappen verwendet. So entwickelte beispielsweise Heinrich von Pfalzpaint im Jahr 1460 den gestielten Armlappen, bei dem die Nase über zwei Teiloperationen als gestielte Fernlappenplastik aus der Haut der Innenseite des Oberarms nachgebildet wurde (Greig et al., 2015). Frank Hastings Hamilton beschrieb im Jahr 1854 den „cross-leg-flap“ zur Behandlung des chronischen Ulcus cruris (Contedini et al., 2012; Hamilton, 1854). Dieses Verfahren ermöglichte den Gewebettransfer von einem Bein zum anderen und kommt auch heute noch in Ausnahmefällen zum Einsatz (Long et al., 1993; Reisler et al., 2016).

Durch die Einführung des OP-Mikroskops durch Carl Olof Siggesson Nylen im Jahr 1921 (monokular) und Gunnar Holmgren im Jahr 1923 (binokular) wurden schließlich auch freie Lappenplastiken möglich (Tamai, 2009).

Weiterentwicklungen bezüglich Anästhesie, Antibiotika, Hämatologie und Wundmanagement führten mit der Zeit zu immer besseren postoperativen Ergebnissen, so dass Lappenplastiken zum festen Bestandteil der Arbeitstechniken plastischer Chirurgen wurden. Verbesserungen der chirurgischen Techniken und Fortschritte auf den Gebieten der Mikrochirurgie und der Mikroiinstrumente führten außerdem zu immer komplexeren Gewebetransfers bis hin zu Gesichtstransplantationen (Sosin & Rodriguez, 2016).

2.3 Molekulare Mechanismen und Folgen von Gewebeischämie

Trotz stetiger technischer Entwicklungen sind ischämische Komplikationen auch heute noch ein relevantes Problem der Lappenchirurgie.

Ähnlich einem thrombembolischen Geschehen, das plötzlich die Zufuhr von oxygeniertem Blut unterbricht und die Gewebeversorgung beeinträchtigt, kann auch eine chirurgische Präparationen die Blutversorgung des Gewebes beeinträchtigen oder unterbrechen und somit zu einer Gewebeischämie in gesundem Gewebe führen. Trotz sorgfältiger Lappenplanung bezüglich seiner Perfusion, ist die ausreichende Versorgung der Lappenperipherie mit Sauerstoff und Nährstoffen gerade bei großen Lappenplastiken oft kritisch und eine inadäquate mikrovaskuläre Perfusion kann zu partiellen oder totalen Gewebenekrosen, verzögerter Wundheilung oder Wunddehiszenzen führen (Carroll et al., 1997; Harder et al., 2005). So kommt es bei etwa 20-33% der lokalen Lappenplastiken zu partiellen Nekrosen (Moran & Serletti, 2001; Tanaka et al., 2003).

Wird ein Gewebe nicht adäquat mit Blut und somit Sauerstoff versorgt, so wird der zelluläre Stoffwechsel behindert und kommt letztendlich völlig zum Erliegen. Kann das Gewebe nicht schnell genug wieder mit Sauerstoff versorgt werden, kommt es zum Absterben von Zellen („Infarkt“). Eine passagere Ischämie kann für das betreffende Gewebe ohne Folgen sein, wird jedoch die Toleranz des Gewebes überschritten oder ist das Maß der Minderversorgung so hoch, dass ein dauerhafter Gewebsschaden droht, spricht man von „kritischer Ischämie“. Die Ischämietoleranz ist hierbei von Gewebe zu Gewebe verschieden und reicht von wenigen Minuten (z.B. Gehirn) bis hin zu mehreren Stunden (z.B. Haut).

Im Rahmen der Ischämie wird der aerobe Stoffwechsel auf die weniger effiziente anaerobe Glykolyse umgestellt und energiereiche Substrate werden verbraucht. Innerhalb weniger Minuten kommt es zu einem nahezu vollständigen Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP), dem universellen Energielieferanten der Zelle. Die membranständige, ATP-abhängige Na⁺/K⁺-Pumpe kann das Membranpotenzial nicht mehr aufrechterhalten, Natrium- und Chloridionen strömen in die Zelle ein und ziehen Wasser mit sich, sodass ein intrazelluläres Ödem entsteht. Auf Grund der Minderversorgung mit Sauerstoff kommt es zusätzlich zur Akkumulation von sauren Stoffwechselprodukten der anaeroben Glykolyse und zur Entstehung einer Azidose. Außerdem entstehen in der Zelle freie Sauerstoffradikale, die auf Grund der Minderperfusion nicht abtransportiert werden können und durch Lipidperoxidation die Zellmembran schädigen. Das Intrazelluläre Ödem und der durch Azidose und Lipidperoxidation bedingte Zellmembranschaden führen letztendlich zum Untergang der Zelle (Nekrose).

Die Folge ist eine Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes. Durch die Entzündung werden Makrophagen angelockt, die durch die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie Tumornekrosefaktor α (TNF α) auch zur Apoptose von Zellen führen können. Im Gegensatz zum Begriff der Nekrose, unter dem man den am lebenden Organismus stattfindenden, pathologischen Untergang einzelner oder mehrerer Zellen versteht, bezeichnet der Begriff der Apoptose den physiologischen, „programmierten“ Zelltod.

2.4 Strategien zur Verhinderung Ischämie-bedingter Komplikationen

Seit langem wird nach Strategien zur Vermeidung Ischämie-bedingter Komplikationen gesucht, nicht zu Letzt auf Grund der sozio-ökonomischen Auswirkungen durch verlängerte Liegezeiten oder Revisionseingriffe.

Eine der ältesten und aufwändigsten bekannten Methoden ist die Lappenautonomisierung mittels „surgical delay“ (Barthe Garcia et al., 1991; Reinisch, 1974). Hierbei wird die Lappenhebung schrittweise über einen Zeitraum von circa 14 Tagen durchgeführt, um mittels der entstehenden Hypoxie eine Hypervaskularisierung zu induzieren bevor der Lappen endgültig gehoben wird. Diese Hypervaskularisierung entsteht durch den Umbau bereits existenter Gefäße (Arteriogenese), sowie die Entstehung neuer Gefäße (Angiogenese), die dann bei der endgültigen Lappenhebung die adäquate Gewebepfusion ermöglichen. Eine weitere Möglichkeit ist es einzelne zuführende Gefäße, die für die endgültige Lappenhebung unterbrochen werden müssen, bereits im Vorfeld zu durchtrennen (Cinpolat et al., 2014). Diese Methoden sind effektiv, werden aber auf Grund ihrer Invasivität und ihres hohen Zeitaufwands heutzutage nur in Ausnahmefällen eingesetzt.

Aus diesem Grund wurden alternative Therapieansätze gesucht, um die gleichen Gewebe-protectiven Mechanismen mit weniger invasiven Maßnahmen

zu induzieren. Bei der Prä- und Postkonditionierung von Gewebe werden hierfür supraphysiologische, jedoch subletale Reize im Vorfeld oder im Verlauf der Ischämie auf das Gewebe appliziert (zum Beispiel Sauerstoffmangel, lokal-physikalischer oder systemisch-pharmakologischer Stress) um so das gefährdete Gewebe vor den Auswirkungen einer dauerhaften Ischämie, bzw. eines Ischämie-/Reperfusionsschadens schützen. Die Präkonditionierung soll hierbei mittels einer Erhöhung der Ischämietoleranz des Gewebes, einer Aufrechterhaltung der Mikrozirkulation, sowie über antiinflammatorische und pro-angiogenetische Effekte zu einer Verbesserung des Gewebeüberlebens führen.

Unterbricht man ein zuführendes Gefäß nur vorübergehend, so spricht man von „ischämischer Präkonditionierung“. Die Rate des ATP-Verbrauchs kann hiermit verlangsamt werden, so dass man beispielsweise bei koronarer Okklusion die Infarktgröße signifikant verringern kann (Hausenloy et al., 2016; Murry et al., 1986; Murry et al., 1990). Da nicht immer ein klar definiertes zuführendes Gefäß existiert, oder eine transiente Okklusion unmöglich ist, ist auch das ischämische Präkonditionieren nicht immer durchführbar.

Lokal-physikalische Optionen umfassen die elektrische Stimulation des Gewebes (Dogan & Ozyazgan, 2015), die Verwendung von Stoßwellen (Tobalem et al., 2013), sowie die Applikation von lokaler Kälte (Yunoki et al., 2002) und Hitze (Harder et al., 2005; Yamashita et al., 1998).

Der vielleicht eleganteste Ansatz ist die systemisch-pharmakologische Gewebekonditionierung. Geeignete Substanzen sollen hierbei nach der systemischen Applikation ihre gewebeprotektiven Eigenschaften entfalten (z.B. antiapoptotische, antiinflammatorische oder antioxidative Wirkung) und den Ischämie-bedingten Zelltod verringern.

Substanzen, die in tierexperimentellen Versuchen bereits vielversprechende Ergebnisse gezeigt haben sind zum Beispiel Monophosphoryl Lipid A (Harder et al., 2005), Ghrelin (Rezaeian et al., 2012) und Erythropoietin (EPO) (Harder et al., 2009).

2.5 Erythropoetin

Erythropoetin (EPO) ist ein 34.000 Dalton großes, 165 Aminosäuren langes Glykoprotein-Hormon (Beru et al., 1986) das zunächst für seine regulatorische Funktion der Erythropoese im Knochenmark bekannt war (Krantz, 1991). Im Menschen wird das Hormon zu ca. 90% von den peritubulären interstitiellen fibroblastenähnlichen Typ I Zellen der Nierenrinde und des äußeren Nierenmarks produziert. Circa 10% werden außerhalb der Niere, vor allem in den die Zentralvene umgebenden Hepatozyten der Leber (Koury et al., 1991), aber auch in Hirn (Masuda et al., 1994), Milz, Lunge und Hoden gebildet (Kowalczyk et al., 2011). Es wird bei Hypoxie freigesetzt und vermittelt seine Effekte über eine Konformationsänderung des Erythropoetin-Rezeptors (EPO-R) (Mulcahy, 2001). Nach der Ausschüttung in den Blutstrom, bindet es im Knochenmark an Erythropoetin-Rezeptoren auf der Membranoberfläche von Erythroblasten, was zur Teilung und Reifung der Zellen führt. Hierzu bindet EPO im Knochenmark an den EPO-Rezeptor der BFU-Vorläuferzellen (*Burst Forming Unit*-Erythroblasten), stimuliert deren Übergang in die CFU-Erythroblasten (*Colony Forming Unit*-Erythroblasten) und beschleunigt deren Ausreifung (Koury et al., 1988). Außerdem schützt es reife Erythrozyten vor der Apoptose und führt so zu einem längeren Überleben der roten Blutzellen (Kowalczyk et al., 2011). Des Weiteren konnten EPO-Rezeptoren auch in anderen Geweben nachgewiesen werden, darunter Kardiomyozyten, glatten Muskelzellen, retinalen Zellen, Zellen der Prostata, Zellen menschlicher

Haarfollikel (Fried et al., 1969) und sogar Haarzellen im Innenohr (Monge Naldi et al., 2009).

Die dosisabhängige Hämatokritsteigerung ist allerdings kontraproduktiv für die Rheologie des Blutes und wirkt sich letztendlich negativ auf die Mikrozirkulation aus (Awwad et al., 1983; Johnson et al., 1990). Dennoch konnten EPO gleichzeitig verschiedene gewebeprotective Effekte nachgewiesen werden. Darunter auch eine Stickstoffmonoxid-vermittelte Relaxation der arteriellen Gefäße (Haroon et al., 2003), die Induktion von Angiogenese (Ribatti et al., 1999) und eine gesteigerte Geweberegeneration (Calvillo et al., 2003). Zusätzlich erhöht EPO die Expression antioxidativer Enzyme und verringert die Produktionsrate freier Radikale (Kowalczyk et al., 2011). Diese Effekte wurden bereits in ischämisch gefährdetem Gewebe in Herz (Burger et al., 2009), Nieren (Patel et al., 2004), Leber (Sepodes et al., 2006) und Gehirn (Hasselblatt et al., 2006) nachgewiesen.

2.6 Erkenntnisse aus Vorarbeiten

Die gewebeprotectiven Effekte von EPO konnten auch in ischämisch gefährdetem Haut-Muskelgewebe nachgewiesen werden (Rezaeian et al., 2008). In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass eine Verabreichung von relativ niedrigen und möglichst nicht Hämatokrit-relevanten Dosierungen muskulokutanes Gewebe vor Nekrose schützen konnte. Wiederholte Dosen von 500 internationalen Einheiten (I.E.)/kg Körpergewicht (KG) erhöhten den Hämatokrit nur leicht und hatten einen gewebeprotectiven Effekt (Harder et al., 2009). Wiederholte Dosen von 5000 I.E./kg KG hoben hingegen den Hämatokrit signifikant an und resultierten in einer Verschlechterung der Rheologie. Eine Präkonditionierung, bzw. Prä- und Postkonditionierung war der alleinigen Postkonditionierung überlegen (Rezaeian et al., 2013).

2.7 Zielsetzung der Studie

Basierend auf den bereits gewonnenen Erkenntnissen, war es das Ziel dieser Studie festzustellen, ob EPO in sehr niedriger, im Vergleich zu den Vorarbeiten noch weiter reduzierter Dosierung gewebe- und schmerz- protektiv wirkt. Des Weiteren wurde ein Schema mit initial hohen Dosen EPO und einer raschen Reduktion auf die Erhaltungsdosis evaluiert. Hiermit sollten die gewebe- und schmerz- protektiven Eigenschaften ideal genutzt werden, ohne den Hämatokrit zu erhöhen. Dementsprechend wurde in der vorliegenden Studie untersucht, welche Auswirkungen die unterschiedlichen Injektionsschemata auf die Nekrosefläche eines muskulokutanen Lappens haben. Zum Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen wurden zusätzlich folgende Fragestellungen behandelt:

- Welche Auswirkungen hat eine potenzielle Hämatokritsteigerung durch EPO auf die Blut-Rheologie?
- Wie beeinflusst EPO die Fließgeschwindigkeit des Blutes in den arteriellen, venösen und kapillären Gefäßen und somit letztendlich die Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen?
- Welchen Einfluss hat EPO auf den Durchmesser der arteriellen, venösen und kapillären Gefäße? Verändert sich die Expression der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthetase im Verlauf des Beobachtungszeitraumes?
- Welchen Einfluss hat EPO auf die Fließmenge des Blutes in den arteriellen, venösen und kapillären Gefäßen?

- Verändert EPO die Funktionelle Kapillardichte (FCD) des Gewebes?
- Welchen Einfluss hat EPO auf das Leukozytenverhalten in den arteriellen und venösen Gefäßen?
- Kann EPO die Apoptoserate in kritisch perfundiertem Gewebe verringern?
- Ist EPO in der Lage die Neubildung von Gefäßen zu induzieren?
Verändert sich die Expression des Vasoendothelial Growthfactors (VEGF) EPO-bedingt im Verlauf des Beobachtungszeitraumes?

3. Material und Methoden

3.1 Tiere

Alle Tierexperimente wurden unter Berücksichtigung der geltenden deutschen Tierschutzgesetze durchgeführt und von der zuständigen Stelle der Regierung von Oberbayern genehmigt. Insgesamt wurden 18 Mäuse ((C57BL/6; 18 Wochen alt; 26-28 g Körpergewicht [KG]; Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) für die Studie verwendet. Zwischen der Ankunft der Tiere und dem Beginn der Untersuchungen lag eine 14-tägige Eingewöhnungszeit. Außerdem wurden die Tiere hinsichtlich ihres Gesundheitszustandes untersucht und nur gesunde Tiere verwendet. Die Tiere wurden bei Raumtemperatur von 22-24°C, relativer Luftfeuchtigkeit von 60-65% und einem Hell-Dunkel-Zyklus von 12:12 Stunden gehalten und hatten freien Zugang zu Trinkwasser und regulärem Labor-Futter (autoklaviertes Mäusefutter Ratte/Maus, 10 mm rund pelletiert, spezialbehandelt, Haltungsfutter No. 1324SP und Zuchtfutter No. 1314SP; Fa. Altromin, Lage, Deutschland). Um den Tieren nach der Anlage der Rückenhautkammer das Fressen zu erleichtern, wurden zusätzlich in Wasser eingeweichte Pellets im Käfig des Tieres platziert. Für die Zeit der Untersuchung wurden die Tiere in Einzelkäfigen gehalten, damit die angebrachte Rückenhautkammern nicht von Artgenossen beschädigt werden konnten. Außerdem wurde den Tieren kein Nestbaumaterial angeboten, in dem sich das Tier mit der Kammer verheddern konnte (z.B. Zellstoffstreifen etc.). Alternativ wurde Nestbaumaterial aus Baumwollfasern verwendet.

3.2 Narkose

Für die Narkose der Tiere zum Anbringen der Rückenhautkammer sowie zum Durchführen der Intravitalmikroskopie wurde eine Kombination aus Medetomidin (Domitor®; Pfizer, Berlin, Deutschland) 0,5mg/kg KG, Midazolam

(Dormicum®; Roche, Mannheim, Deutschland) 5mg/kg KG und Fentanyl (Fentanyl-Janssen®; Roche, Mannheim, Deutschland) 0,05mg/kg KG zur intraperitonealen Gabe verwendet. Nach der Injektion wurde das Tier zunächst in seinen Käfig zurück gesetzt und abgewartet bis der Stellreflex des Tieres erloschen war, sodass von einer ausreichenden Narkosetiefe ausgegangen werden konnte. Während der Zeit der Narkose wurde das Tier soweit möglich auf einer Wärmeplatte (Typ 13511; Fa. MEDAX GmbH & Co. KG, Neumünster, Deutschland) gelagert, um ein Auskühlen zu verhindern. Zur Antagonisierung der Narkose nach Abschluss der Experimente wurde eine Kombination aus Atipamezol (Antisedan®; Pfizer, Berlin, Deutschland) 2,5mg/kg KG, Flumazenil (Anexate®; Roche, Mannheim, Deutschland) 0,5mg/kg KG und Naloxon (Naloxon®; Inresa, Freiburg, Deutschland) 1,2 mg/kg KG subkutan (s.c.) injiziert. Sobald das Tier begann sich aufzurichten, wurde es in den Käfig zurückgesetzt und für mindestens eine Stunde nachbeobachtet.

3.3 Rückenhautkammer

Die verwendeten Rückenhautkammern bestanden aus je zwei Kammerhälften, die mittels drei Schrauben verbunden wurden, um den Haut-Muskel-Lappen zwischen den Hälften einzubringen (siehe Abb. 1A). Der Blick auf die Unterseite des Lappens wurde durch ein mittels Sprengring gesichertes Deckglas freigegeben (siehe Abb. 1A). Für das Anbringen der Schrauben wurden jeweils passende Schraubenzieher verwendet (siehe Abb. 1B). Vor der Operation der Tiere wurden die beiden Hälften der Titan-Kammer desinfiziert und eine der Hälften mit selbstklebender Schaumstoffdichtung (tesamoll® Standard Schaumstoffdichtung; Tesa SE, Norderstedt, Deutschland) präpariert, um die Dichte der Kammer sicherzustellen (siehe Abb. 1C). An der nicht beklebten

Hälfte wurden zwei Schrauben mit Muttern befestigt, um die beiden Hälften der Kammer später miteinander verbinden zu können (siehe Abb. 1C und 1D).

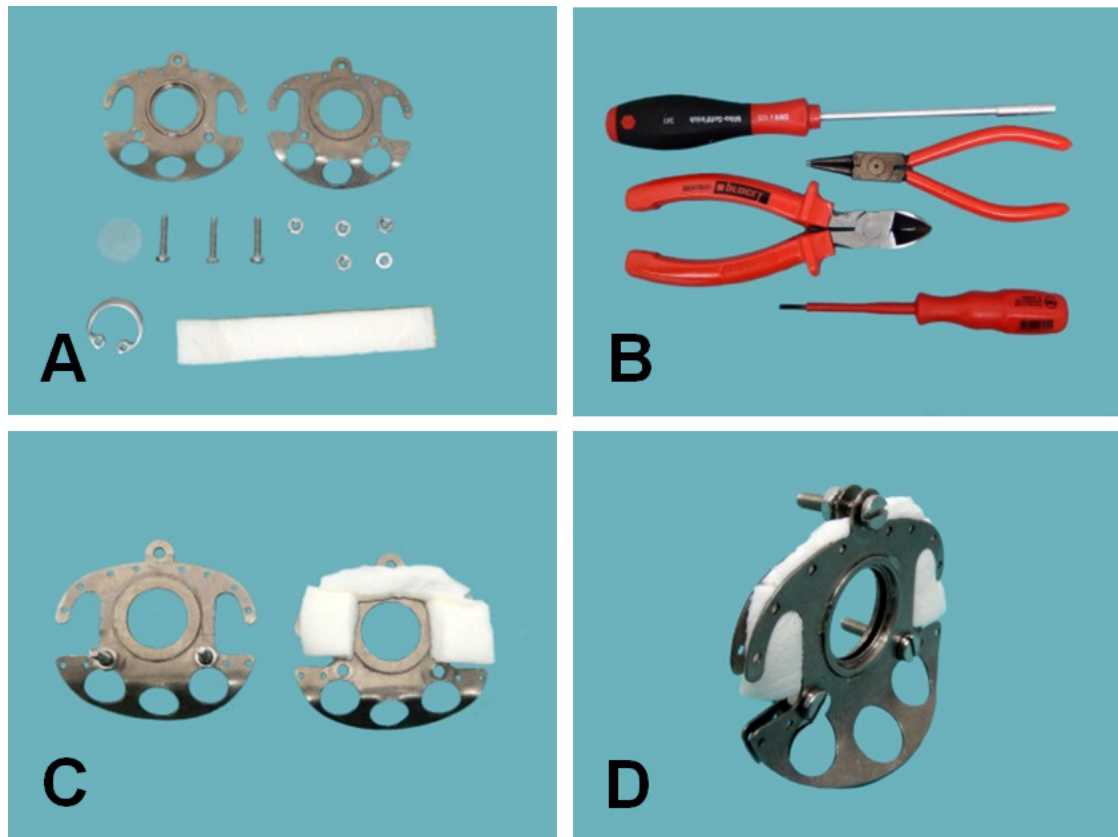


Abbildung 1: Rückenhautkammer mit Instrumentarium (Harder et al., 2014)
(A) Rückenhautkammer in Einzelteilen; (B) verwendetes Werkzeug; (C) Rückenhautkammer mit Schaumstoff versehen; (D) Rückenhautkammer zusammengesetzt.

Das Versuchstier wurde nun narkotisiert und eine Blutprobe aus der Schwanzvene zur späteren Analyse entnommen. Auf die Augen des Tieres wurde zum Schutz vor Austrocknung und möglicher Keratitisbildung Salbe (Bepanthen® Wund- und Heilsalbe; Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) aufgetragen. Die Maus wurde am Rücken zuerst mit einem elektrischen Rasierer (Modell ISIS; Fa. Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) geschoren und anschließend mit Enthaarungscreme (Balea® Enthaarungscreme; dm - drogerie markt GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) enthaart. Das nun folgende Anbringen der Rückenhautkammer erfolgte unter sterilen Bedingungen.

Um die Position der Kammer zu bestimmen, wurde die Rückenhautfalte hochgezogen und vor eine Lichtquelle gehalten. Die Gefäße, die die Rückenhaut der Maus versorgen, sollten auf halber Höhe der Kammer zu liegen kommen. Sobald die Position der Kammer mit Hilfe der Lichtquelle abgeschätzt worden war, wurde im kranialen und kaudalen Teil der Hautfalte mit einem Hilfsfaden eingestochen und die Rückenhautfalte der Maus daran aufgehängt (siehe Abb. 2A). Die Kammer wurde mit Hilfe von zwei weiteren Nähten vorläufig an der Rückenhautfalte befestigt und die für die Schrauben nötigen Löcher wurden mittels einer Mikroschere geschnitten (siehe Abb. 2B). Zur Planung des Hautlappens wurde die Kammer abgenommen und die zunächst angebrachten Hilfsfäden wurden entfernt. Die Mittellinie der Rückenhautfalte wurde anhand der Einstiche der Hilfsfäden eingezeichnet. Der Lappen wurde dabei zwischen den Löchern für die Schrauben der Kammer, im rechten Winkel zur Wirbelsäule mit einer Größe von 15x11mm auf beiden Seiten der Wirbelsäule des Tieres angezeichnet und umschnitten (siehe Abb. 2C und 2D). Dabei wurden die zu- und abführenden Gefäße (kaudal: Deep Circumflex Iliac Artery (DCIA); kranial: Lateral Thoracic Artery (LTA)) durchtrennt, sodass ein randomisiert perfundierter Lappen entstand (siehe Abb. 2E).

Um den Blick auf die Unterseite des Lappens durch das Sichtfenster der Kammer zu ermöglichen, wurde das überschüssige Gewebe entfernt. Hierfür wurde der distale Lappenanteil abgetrennt und für spätere histologische Untersuchungen präpariert, indem das entfernte Gewebe auf ein Stück Kork aufgespannt und für mind. 2 Tage in 3,5-3,7%iger Formaldehyd-Lösung (Otto Fischer GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland) eingelegt wurde. Danach wurde das Gewebe zur späteren histologischen Untersuchung in Paraffin eingebettet.

Der Lappen wurde nur noch in einem dafür markierten Bereich an der Oberkante des Lappens mit der Pinzette gefasst, um Gewebeschäden durch die Instrumente zu vermeiden. Um den Lappen außerdem vor Austrocknung zu schützen, wurde er in regelmäßigen Abständen mit 0,9%iger Kochsalzlösung beträufelt.

Die Schrauben der Kammer wurden nun durch die zuvor geschnittenen Löcher gesteckt und vorläufig mit OP-Klemmchen gegen ein Herausrutschen gesichert. Die verbleibenden kranialen und kaudalen Anteile der Rückenhautfalte wurden am Kammergestell mit jeweils 3 Einzelknopfnähten befestigt (siehe Abb. 2F und 2G). Dafür wurden 3-0 Vicryl Fäden (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verwendet. Der präparierte Lappen wurde anschließend ebenfalls oben an der Rückenhautkammer mit Einzelknopfnähten angenäht (siehe Abb. 2H). Die seitlichen Ränder des Lappens wurden mit 5-0 Ethilon Fäden (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) wieder mit dem angrenzenden Haut-Muskel-Gewebe vernäht (siehe Abb. 2I). Die Verwendung dünnerer Fäden für die seitlichen Nähte empfiehlt sich, da die entstehenden kleineren Nähte später einen dichteren Verschluss der Kammer erlauben.

Unter einem OP-Mikroskop wurde nun die gallertige Schicht des Lappens abgetragen, um einer späteren Ödem-Entwicklung vorzubeugen und den Blick durch das Deckglas der Kammer auf die Lappenunterseite zu optimieren.

Anschließend wurde die zuvor mit Schaumstoff beklebte Gegenseite der Kammer mit 80%igem Ethanol desinfiziert und mehrmals mit 0,9%iger Kochsalzlösung gespült, um einer Irritation des Lappens durch das zuvor verwendete Ethanol vorzubeugen. Die gereinigte Kammerhälfte wurde auf den drei dafür vorgesehenen Schrauben montiert (siehe Abb. 2J und 2K). Die beiden Schrauben an der Basis der Kammer wurden nicht bis zum Anschlag

festgezogen, um den Blutfluss aus dem Pedikel in den Lappen nicht einzuschränken. Um später das Objektiv des Intravital-Mikroskops nicht zu behindern, wurde der überstehende Teil der Schrauben nach dem Anbringen der Muttern mit einer Zange abgetrennt.

Vor dem Einsetzen des Deckglases wurde der Lappen mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Bisbenzimid 33342 (Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland) beträufelt. Abschließend wurde das Deckglas eingesetzt und mit einem Sprengring gesichert. Dabei wurde besonders darauf geachtet, keine Luftblasen unter dem Deckglas einzuschließen, die das spätere Mikroskopieren der Kammer behindern könnten. Bevor die Narkose des Tiers antagonisiert wurde, wurden 0,05-0,1ml 0,9%ige Kochsalzlösung s.c. injiziert um den Flüssigkeitsverlust des Tieres während und kurz nach der Operation auszugleichen. Die Kammern wogen circa 3g und wurden von den Tieren gut toleriert. Es zeigten sich keine Veränderungen in Schlaf- oder Fressverhalten.

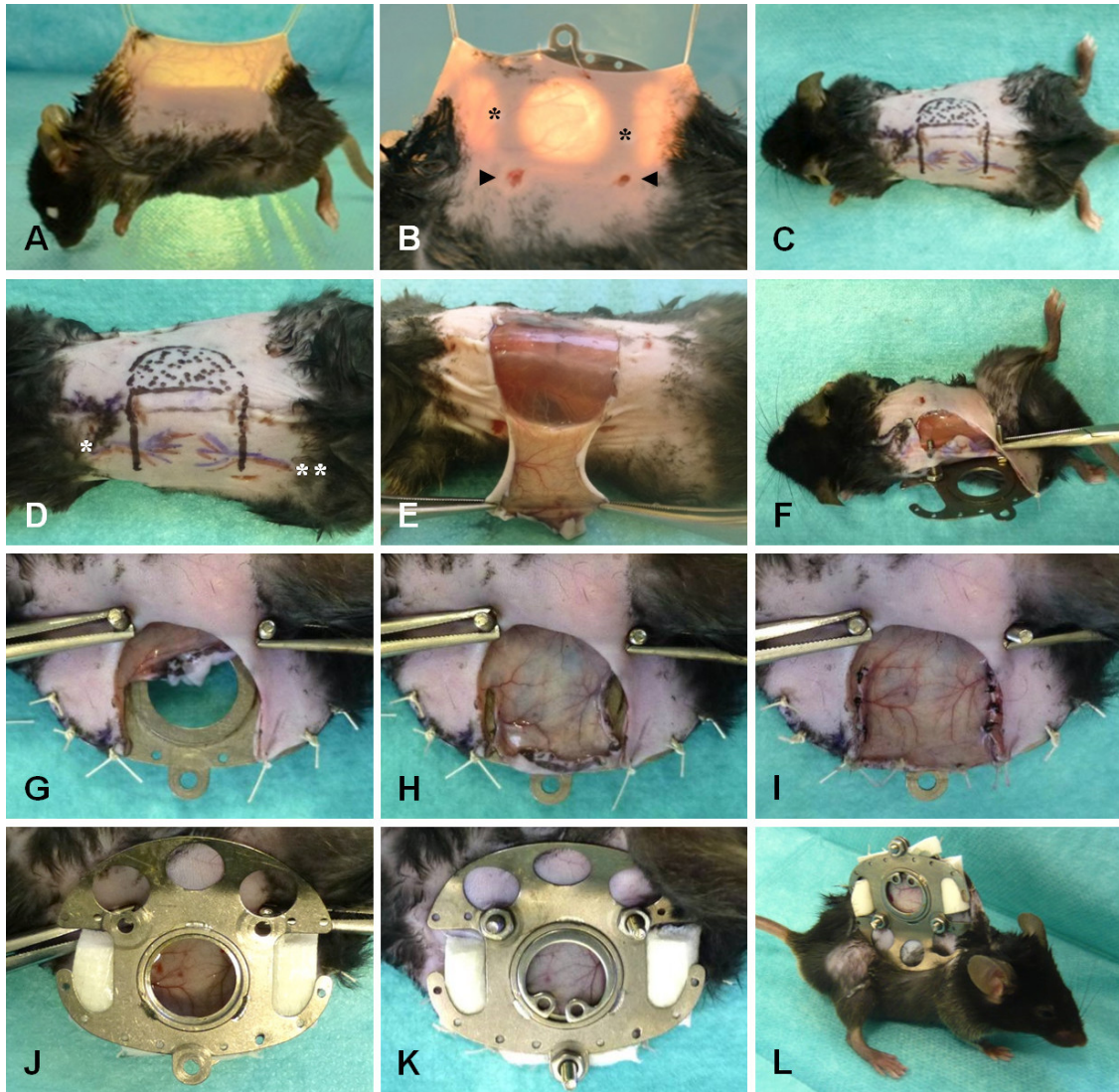


Abbildung 2: Lappenhebung und Kammerpräparation (Harder et al., 2014)
 (A) Aufsuchen der Gefäße, (B) Positionieren der Gefäße (Markierung * und **) in der Mitte der Kammer und Schneiden der Löcher für die Schrauben der Kammer (Markierung mit Pfeilköpfen), (C und D) geplanter Lappen mit überschüssigem Gewebe (gepunktet) und über der Mittellinie markiertem Areal zum Greifen des Lappens mit der Pinzette, (E) Lappen nach der Hebung, (F und G) Annäheren der Rückenhautfalte an der Kammer, (H) Annäheren des Lappens oben an der Kammer, (I) Vernähen der Seiten des Lappens mit dem umliegenden Gewebe, (J) Anbringen der gegenüberliegenden Kammerhälfte, (K) Verschluss der Kammer mit Deckglas und Sprengring, (L) fertige Kammer.

Da im Zuge der Lappenhebung die zu- und abführenden Gefäße des Lappens unterbrochen wurden, wurde der Lappen nachfolgend von seiner Basis aus perfundiert. Dies führte dazu, dass es im distalen Teil des unbehandelten Lappens zunächst zu einem Perfusionsausfall kam, später zur Nekrose. Endgültig demarkierte sich der nekrotische Teil am dritten bis fünften Tag. Beim

unbehandelten Kontroll-Tier sollte die Nekroserate bei ca. 50% liegen (Harder et al., 2004).

Distal des vitalen Gewebes entwickelte sich ein hyperämischer Rand-Saum, gefolgt von einem weißen Gewebesaum, genannt „Falx lunatica“. Histologische Analysen konnten zeigen, dass sich innerhalb der Falx ein interstitielles Ödem entwickelte, es jedoch nicht zu Nekrosen kam (Harder et al., 2005). Zusammen ergab sich eine Transitionszone, die das vitale vom nekrotischen Gewebe trennte.

3.4 Postoperative Versorgung der Tiere

Auf Grund der Konstruktion der Kammer war das Anlegen eines Verbandes nicht notwendig. Nach Verabreichen der Antagonisierung bis zum Zeitpunkt des Erwachens wurde das Tier weiterhin auf einer Heizmatte gelagert. Anschließend wurde das Tier zurück in den vorbereiteten Käfig gesetzt und mindestens eine Stunde nachbeobachtet. Zur intra- und postoperativen Analgesie sowie bei Anzeichen für Schmerzen wurde den Tieren 0,01mg/kg KG Buprenorphin (Temgesic®; Reckitt Benckiser, Heidelberg, Deutschland) s.c. injiziert. Die Injektion der ersten Dosis erfolgte vor der Lappenhebung, eine weitere Dosis wurde den Tieren nach 12 Stunden injiziert. Danach konnte bei Bedarf maximal alle 8 Stunden eine Dosis Buprenorphin verabreicht werden. Als zusätzliche Bedarfsmedikation wurden bis zu 3x/tgl Metamizol-Natrium Tropfen (50 mg/kg KG per os Novaminsulfon; Ratiopharm, Ulm, Deutschland) verwendet. Als mögliche Anzeichen von Schmerz wurden hierbei reduziertes Allgemeinbefinden mit Nahrungsverweigerung, Bewegungsarmut, veränderter Körperhaltung gewertet. Als weitere Anzeichen von Schmerz wurden Abwehrreaktionen und Lautäußerungen bei Palpation der betroffenen Areale, Verhaltensänderungen, Anzeichen von Aggression oder das Bemühen der

Tiere die Fremdkörper zu entfernen gewertet.

3.5 EPO-Regime

Drei Versuchsgruppen zu je 6 Tieren wurden wie folgt behandelt:

1. Prä- und Postkonditionierung mit niedrigen Dosen EPO: Den Tieren wurden 125 I.E./kg KG i.p. jeweils 30 min vor und nach der Lappenhebung, nach 24 h und im Anschluss alle 12 h für den gesamten Beobachtungszeitraum verabreicht (EPO-low).

2. Prä- und Postkonditionierung mit initial hohen Dosen EPO und nachfolgend niedrigen Dosen: Den Tieren wurden 2500 I.E./kg KG i.p. 30 min vor der Lappenhebung, 1250 I.E./kg KG i.p. 30 min nach der Lappenhebung, 500 I.E./kg KG i.p. 24 h nach der Lappenhebung und 125 I.E./kg KG i.p. alle 12 h, beginnend 48 h nach der Lappenhebung für den restlichen Beobachtungszeitraum verabreicht (EPO-high).

3. Kontrollgruppe: Zu den Injektionszeitpunkten der Behandlungsgruppen wurde jeweils 0,1ml 0,9%ige Kochsalzlösung i.p. injiziert (CON).

Intraperitoneale Injektionen wurden hierbei für die wiederholte EPO-Administration bevorzugt, da sie technisch einfacher durchzuführen sind als intravenöse Injektionen und die Peak-Serumkonzentration deutlich schneller erreicht wird, als bei subkutanen Injektionen (Ateshkadi et al., 1993).

Um die gewünschte Konzentration für die intraperitonealen Applikationen zu erreichen wurde Epoetin alpha (rekombinantes human-EPO, Erypo®; Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland) mit 0,9%iger Kochsalzlösung vermischt. Pro Injektion wurden jedem Tier etwa 0,1ml Volumen verabreicht. Die Wirkstofflösung wurde bis zur Verwendung bei maximal 8°C gelagert.

3.6 Intravitalmikroskopie

An den Tagen 1, 3, 5, 7 und 10 wurde der in die Rückenhautkammer integrierte Lappen mittels Intravital-Mikroskopie untersucht. Die Raumtemperatur während der Untersuchungen lag konstant bei über 25°C, da die Platzierung der Maus auf einer Heizdecke unter dem Mikroskop-Objektiv nicht möglich war.

3.6.1 Mikroskop

Verwendet wurde ein Zeiss AxioScope A.1 Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Das Mikroskop enthält ein LED System (Beleuchtungssystem Colibri.2; Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit LED-Strahl Kombinationen für 470 & 425nm, 365 & 490nm und 540 & 580nm. Unterschiedliche Filterblöcke für blaues (Anregungswellenlänge: 450-490nm; Emissionswellenlänge: >520nm), grünes (Anregungswellenlänge: 530-560nm; Emissionswellenlänge: >580nm) und ultraviolettes Licht (Anregungswellenlänge 330-390nm; Emissionswellenlänge: >430nm) konnten je nach Verwendungszweck in den Strahlengang eingebracht werden.

Für die Aufnahme von Bildern und Videos wurde eine AxioCam HSm Kamera (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) verwendet. Bedient wurde das Mikroskop mittel der Software ZEN (Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Die Bilder und Videos wurden zur späteren Analyse auf einer externen Festplatte gespeichert. An den vorgesehenen Tagen wurde das Tier mit einer i.p. Injektion von Medetomidin 0,5mg/kg KG; Midazolam 5mg/ kg KG und Fentanyl 0,05mg/kg KG (siehe auch unter Punkt 3.2) narkotisiert. Zur besseren Einsicht der Kammer wurde der Sprengring abgenommen und das Deckglas vorsichtig mit 0,9%iger Kochsalzlösung gereinigt. Dem narkotisierten Tier wurden anschließend 0,1ml 5% Fluoreszein-Isothiozyanat-Dextran (FITC-Dextran) und

0,1ml 1% Rhodamin 6G (beide Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland) mittels i.v. Injektion in den retrobulbären Venenplexus verabreicht (Steel et al., 2008; Yardeni et al., 2011).

Nach der Injektion der Farbstoffe wurde das Tier auf einer maßangefertigten Plexiglas-Plattform gelagert und mit Fäden fixiert, damit die Rückenhautkammer gerade unter dem Objektiv des Mikroskops zu liegen kam.

3.6.2 Farbstoffe

FITC-Dextran besteht dabei aus dem fluoreszierenden Farbstoff Fluoreszein-Isothiozyanat, der an Dextran gebunden ist (Molekulargewicht 150.000 Da, Exzitationsmaximum 490 nm). Dieser intravenös verabreichte Farbstoff dient zur Kontrastverstärkung von Blutgefäßen und findet Anwendung bei intravitralen Perfusionsstudien am Tiermodell. Das FITC-Dextran Molekül färbt die nicht-zellulären Bestandteile des Blutes ein, sodass bei höheren Vergrößerungen die Blutzellen als dunklere Aussparung wahrgenommen werden können.

Rhodamin 6G (479Da, Exzitationsmaximum 528nm) ist ein fluoreszierender Farbstoff, der zur *in-vivo*-Anfärbung von Leukozyten dient. Die Anfärbung entsteht durch Bindung der Substanz im Zellkern. Hierdurch werden Leukozyten und Thrombozyten, im Gegensatz zu den kernlosen Erythrozyten, markiert und können analysiert werden.

Durch die Bestrahlung mit Licht unterschiedlicher Wellenlänge können die verschiedenen Farbstoffe angeregt werden und strahlen wenige Nanosekunden später Licht ab, das vom Mikroskop aufgenommen wird.

Das bereits bei der Anlage der Rückenhautkammer topisch applizierte Bisbenzimid 33342 (616Da, Exzitationsmaximum 355nm) färbt die nukleären Komponenten der Zellen. Kommt es im Zuge des apoptotischen Zelltodes zur Kondensation, Fragmentierung und Margination des Zellkerns, kann die

entstehende Akkumulation des Farbstoffes zur Unterscheidung der apoptotischen Zellkerne von den unversehrten genutzt werden, um die Zahl der apoptotischen Zellen pro mm^2 zu bestimmen.

3.6.3 Mikroskopie-Protokoll

Die auf einer Plexiglas-Plattform waagrecht fixierte Kammer wurde zuerst mit einer Digitalkamera (mit Stativ) abfotografiert (siehe Abb. 3A), anschließend wurde die Maus zusammen mit der Plexiglas-Plattform unter dem Mikroskop-Objektiv platziert.

Im Verlauf der Mikroskopie wurden folgende Objektive verwendet: x2,5 numerische Apertur (NA) = 0,06 für die Panorama-Ansicht der Kammer; x5, NA = 0,16; x10, NA = 0,32; x20, NA = 0,50; x50, NA = 0,55.

Mit dem x2,5 Objektiv wurde zunächst die gesamte Kammer gescannt. Die gewünschte Panorama-Aufnahme der Kammer wurde dafür aus einzelnen Teilaufnahmen zusammengesetzt (siehe Abb. 3B). Anhand der entstandenen Panorama-Aufnahme wurde die Kammer in eine proximale (Lappenbasis), eine mediale (kritische Zone) und eine distale Zone (Nekrosezone) aufgeteilt. Pro Drittel wurden zwei markante Gefäßkreuzungen aus jeweils einer Arterie und einer Vene ausgewählt und zum späteren Wiederauffinden in einem Schema der Kammer markiert.

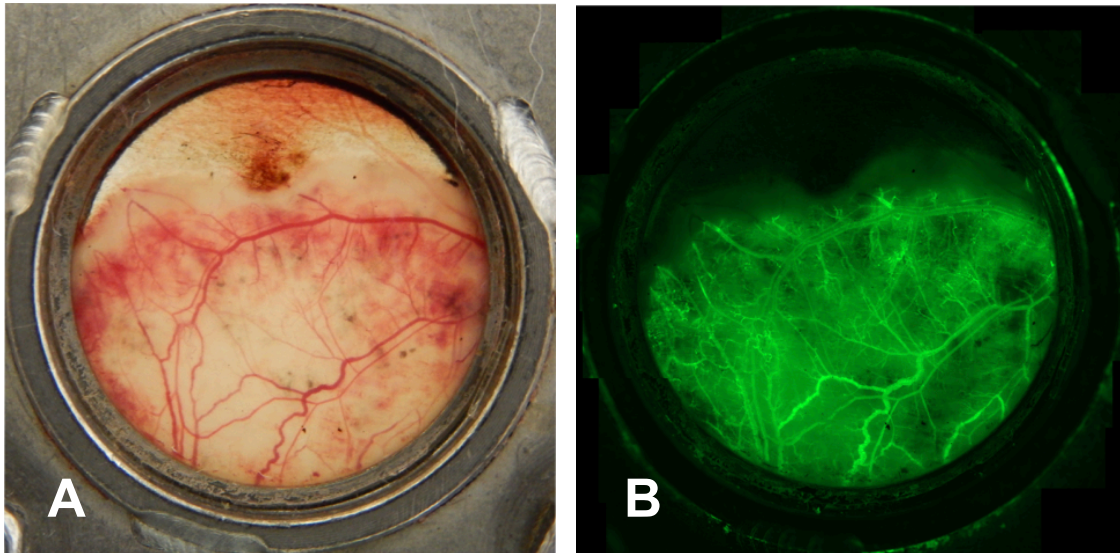


Abbildung 3: Übersichtsaufnahmen
Fotoaufnahme (A) und Panoramaaufnahme (B) einer mit EPO behandelten Kammer

Pro ausgewählter Region (Region of Interest / ROI) wurden Aufnahmen nach folgendem Schema gemacht.

1. FITC-Filter:
 - x5 Foto: Gefäßkreuzung
 - x10 Foto: Gefäßkreuzung
 - x10 Video: Gefäßkreuzung
 - x20 Foto: Gefäßkreuzung (siehe Abb. 4A)
 - x20 Video: Gefäßkreuzung
2. Rhodamin-Filter:
 - x20 Video: Gefäßkreuzung (siehe Abb. 4B)
3. FITC-Filter:
 - x20 Video: umliegendes Kapillarfeld (2x)
 - (siehe Abb. 4C)
4. Bisbenzimid-Filter:
 - x50 Video: apoptotische Zellen (2x)
 - (siehe Abb. 4D)

Zusätzlich wurden drei Foto-Aufnahmen (x5, x10, x20) und zwei Video-Aufnahmen (x10, x20) der Übergangzone mit dem FITC-Filter gemacht und die hierfür ausgewählte Stelle ebenfalls im Schema der Kammer markiert.

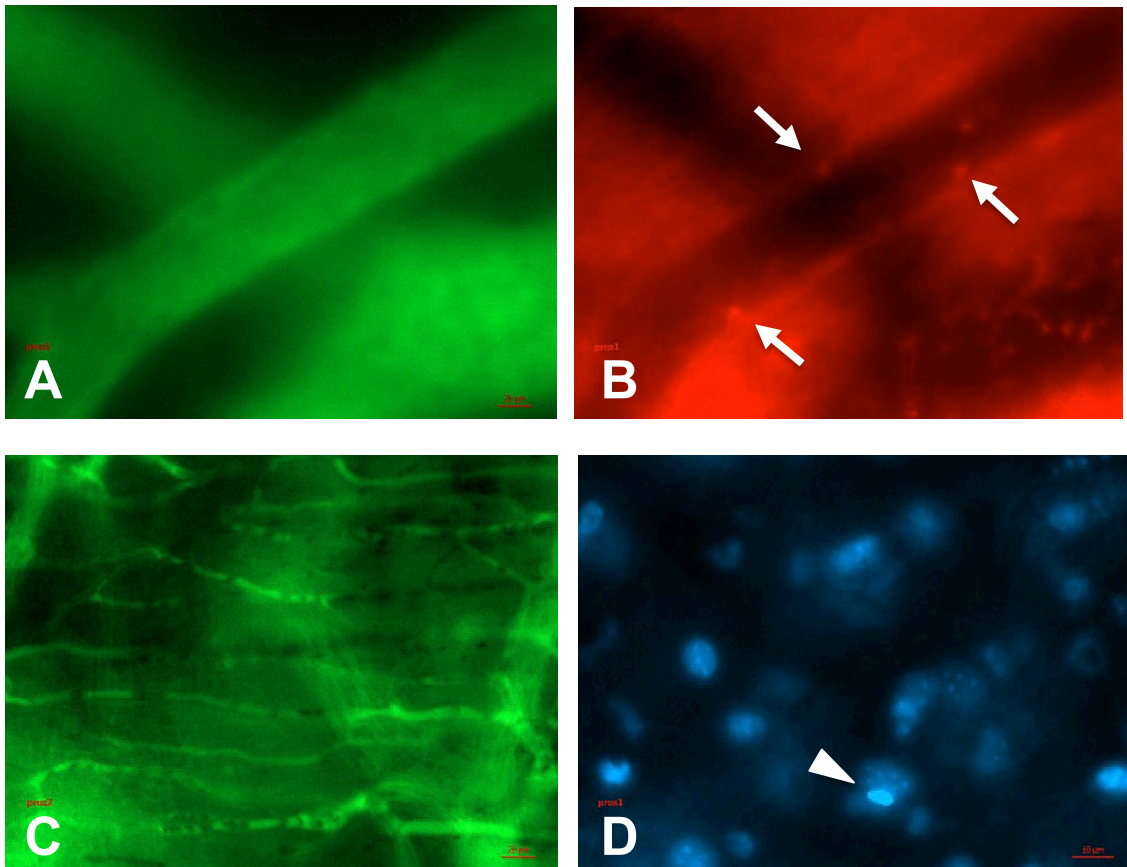


Abbildung 4: Gefäßbündel (FITC, Rhodamin), Kapillarfeld, Apoptosen
 (A) Gefäßbündel mit Arterie im Vordergrund und Vene im Hintergrund nach FITC-Applikation;
 (B) Gefäßbündel nach Applikation von Rhodamin mit Leukozyten (Pfeile) im Blutstrom; (C)
 Kapillarfeld nach FITC-Applikation; (D) Zellkernaufnahme nach Bisbenzamid-Applikation mit
 apoptotisch bedingter nukleärer Kondensation (Pfeilspitze)

3.6.4 Analyseverfahren

Für die spätere Analyse der Foto- und Videoaufnahmen wurde das dynamische Bildanalysesystem CapImage (Zeintl Software, Deutschland) verwendet (Klyscz et al., 1997). Aus den Panoramaaufnahmen der Kammer wurde der Anteil der Lappennekrose bestimmt. Hierfür wurde mittels planimetrischer Messung die Fläche der Nekrose und die Gesamtfläche bestimmt und anschließend ins Verhältnis gesetzt.

Aus den Aufnahmen der Gefäßbündel wurden die Parameter arterioläre und venuläre Fließgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$) und der jeweilige Durchmesser des Gefäßes (μm) bestimmt. Der Gefäßdurchmesser wurde hierfür im aufgenommenen Gefäßbündel im rechten Winkel zur Gefäßwand gemessen.

Für die Analyse der Geschwindigkeit der Blutzellen wurde aus einem linearen Ausschnitt des Gefäßes in Fließrichtung des Blutes über die Dauer von 15 s ein Line-Shift-Diagramm erstellt. Hierfür wurden während der Messperiode die Grauwerte entlang der Messlinien erfasst und die Grauwerte entlang der Messlinie in einem x-y-Diagramm dargestellt. Die x-Achse bildete hierbei die Zeit und die y-Achse die Länge der Messlinie. Jede Blutzelle, die sich innerhalb der Messperiode entlang einer Messlinie bewegte, bewirkte eine schräge Linie in dem Diagramm. Die Geschwindigkeit wurde aus der Steigung dieser schrägen Linie berechnet.

Aus den aufgenommenen umliegenden Kapillarfeldern wurden die kapilläre Fließgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$), der kapilläre Durchmesser (μm), die funktionelle Kapillardichte (Gesamtlänge perfundierter Kapillaren pro analysiertem Gesichtsfeld in cm/cm^2), sowie der Tortuositätsindex der Kapillaren (tatsächliche Strecke der Kapillare zwischen Beginn und Endpunkt / minimale Strecke zwischen Beginn und Endpunkt) bestimmt. Für die Ausmessung der funktionellen Kapillardichte wurden in einer Aufnahme der Vergrößerung $\times 20$ die durchbluteten Kapillaren nachgefahren und die entstandene Strecke gemessen. Für den Tortuositätsindex wurde eine Kapillare soweit wie möglich durch das Bild verfolgt und die gemessene Strecke durch die Länge der direkten Verbindung zwischen Anfangs- und Endpunkt geteilt.

Die Analyse des Fließverhaltens der Leukozyten beinhaltete vier Parameter; zum einen die am Endothel entlang rollenden, zum anderen die bereits am Endothel adhärenen Leukozyten, diese wurden jeweils in den arteriellen und venösen Gefäßen bestimmt. Die am Gefäßendothel adhärenen Leukozyten wurden definiert als sich innerhalb von 15 Sekunden nicht bewegende Zellen. Für die Messung notiert wurde die Anzahl (n) der Zellen pro mm^2

Endotheloberfläche. Für die Auszählung der rollenden Leukozyten wurde eine quer im Gefäß verlaufende Referenzlinie definiert und die Zellen gezählt, die diese Linie innerhalb von 15 Sekunden passierten. Für die Messung notiert wurde die Anzahl der Zellen/15 sec.

Unter Verwendung des DNA-bindenden Fluorochroms Bisbenzimid H33342 wurden charakteristische apoptotische Zellen pro mm² mit Zeichen nukleärer Kondensation, Fragmentation und Margination identifiziert und ausgezählt.

Morphologische Veränderungen im Sinne einer Angiogenese, wie mikrovaskuläres Remodelling oder Gefäßaussprossungen wurden in den Aufnahmen der Übergangszone aufgesucht und quantifiziert (cm/cm²) indem die neu entstandenen Gefäße in einer Aufnahme mit der Vergrößerung x20 nachgefahren und die entstandene Strecke gemessen wurde.

3.7 Analyse der Blutproben

An den Tagen 0, 3, 7 und 10 wurden den Versuchstieren während der Narkose für die Intravitalmikroskopie jeweils maximal 200µl Blut über die Schwanzvene entnommen. Die Proben wurden umgehend mit einem für Tier-Blut bestimmten Analysegerät (poch-100iV Diff, Sysmex, Norderstedt, Deutschland) bezüglich des Hämatokrits und der Hämoglobin-Konzentration untersucht.

3.8 Euthanasie und Explantation der Kammer

Nach dem Beobachtungszeitraum von 10 Tagen erfolgte die Euthanasie gemäß EU-Empfehlung durch eine mindestens dreifache Überdosis (150mg/kg KG) Pentobarbital (Narcoren®, Merial, Halbergmoos, Deutschland), welches i.p. injiziert wurde. Im Anschluss an die Euthanasie erfolgte die Explantation der Rückenhautkammer und der umliegenden Rückenhaut. Es erfolgte nun die Gewebeasservierung zur histologischen Untersuchung. Hierzu wurde das Gewebe des Lappens auf ein Stück Kork aufgespannt und für mind. 2 Tage in

3,5-3,7%iger Formaldehyd-Lösung (Otto Fischer GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland) eingelegt. Danach wurde das Gewebe zur späteren histologischen Untersuchung in Paraffin eingebettet. Der nekrotische Anteil des Lappens wurde verworfen. Als Vorsichtsmaßnahme wurde den Tieren abschließend zusätzlich das Genick gebrochen.

3.9 Immunhistologische Analyse der Gewebeproben

Ergänzend zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Tiere wurden immunhistologische Färbungen der Proteine endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) und vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF) angefertigt.

eNOS ist ein im Gefäßendothel vorkommendes Enzym, das über die Ausschüttung von NO eine Relaxation des Gefäßes vermittelt und somit im Hinblick auf Veränderungen des Gefäßdurchmesser und des Blutflusses untersucht wurde (Marsden et al., 1992). VEGF hingegen vermittelt die Bildung neuen Endothels im Rahmen der Angiogenese und lieferte somit zusätzliche Informationen über die stattfindende Neoangiogenese (Shweiki et al., 1992).

Für die Anfertigung der Immunhistologie wurden die während der Kammerpräparation, sowie nach der Euthanasie der Versuchstiere gewonnenen Gewebeproben in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Aus den entstandenen Paraffinblöcken wurden 6µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger verbracht.

Die zu untersuchenden Proteine konnten mittels Bindung eines spezifischen Antikörpers (Primärantikörper) an das gesuchte Protein nachgewiesen werden. Zunächst wurde die endogene Peroxidase blockiert, indem die Schnitte für 5 min in einer Lösung aus Tris gepufferter Salzlösung (Tris-buffered Saline Solution / TBS) mit 3% H₂O₂ inkubiert wurden. Anschließend wurden die Proben

über Nacht bei 4°C mit einem polyklonalen gegen Maus-eNOS (vorverdünnt, Abcam, Cambridge, UK) bzw. Maus-VEGF (Verdünnung 1:100, Abcam, Cambridge, UK) gerichteten Kaninchen-Primärantikörper inkubiert.

An den gebundenen Primärantikörper wird in einem zweiten Schritt ein mit dem Enzym Peroxidase beladener Sekundärantikörper gebunden, dessen nachfolgende Enzym-Substrat-Reaktion das gesuchte Protein mittels einer Farbreaktion sichtbar macht. Als Sekundärantikörper wurde ein mit Peroxidase beladener gegen Kaninchen-Protein gerichteter Ziegen-Antikörper (Verdünnung 1:100, Abcam, Cambridge, UK) verwendet. Die Proben wurden nach Auftragen des Antikörpers für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Für die Farbreaktion wurden die Proben anschließend mit dem Chromogen 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland) unter ständiger Kontrolle der Farbreaktion für 1-2 min inkubiert.

Abschließend wurden die Proben mit Mayer Hämalaun (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gegengefärbt, unter einem Deckglas versiegelt und lichtmikroskopisch untersucht.

Als Negativkontrolle dienten Gewebeschnitte der einzelnen Proben, die nur mit dem Antikörper-Puffer an Stelle eines Primärantikörpers inkubiert wurden und dementsprechend keine Farbreaktion zeigten.

Zur Analyse der Schnitte wurde ein semi-quantitatives Bewertungssystem verwendet, bei dem pro Gewebeschnitt fünf Gesichtsfelder mit einer Punktzahl zwischen 0 (= keine Farbreaktion) und 3 (= starke Farbreaktion) bewertet wurden und der Mittelwert berechnet wurde.

3.10 Statistische Analyse

Alle Werte wurden als Mittelwert \pm Standardfehler (Standard Error of the Mean / SEM) angegeben. Die drei Gruppen wurden mittels einer Einweg-

Varianzanalyse (ANOVA) für wiederholte Messungen verglichen, gefolgt von Tukey's Honest Significant Difference Methode, zum Auffinden von Unterschieden zwischen den jeweiligen Gruppen bei gleichzeitiger Korrektur für multiples Testen. Das verwendete Signifikanzniveau war $p = 0,05$ und wurde mit * gekennzeichnet. War der Unterschied im Vergleich mit der EPO-high Gruppe signifikant, so wurde # als Kennzeichen verwendet.

Für den Vergleich über die verschiedenen Zeitpunkte hinweg wurde ein gemischt-lineares Modell berechnet. Dies umfasst einen fixen Effekt für Behandlung, Zeitpunkt und deren Interaktion und einen Zufallseffekt für jedes einzelne Tier. Die p-Werte wurden basierend auf der Kenward-Roger-Annäherung für die Freiheitsgrade berechnet. Die statistische Analyse wurde in R (R-Core-Team, 2014) unter Verwendung des afex Pakets (Singmann et al., 2016) durchgeführt.

4. Ergebnisse

Die Veränderungen des Lappens und die folgenden Ergebnisse beziehen sich jeweils zum einen auf den proximalen Bereich des Lappens, sprich die Lappenbasis und zum anderen auf den medialen Bereich des Lappens, der die Transitionszone zwischen vitalem und nekrotischem Gewebe darstellt. In diesen Bereichen spielten sich die entscheidenden von uns beobachteten Veränderungen ab. Der distale Bereich des Lappens war kaum von Interesse, da sich entsprechend des Designs des verwendeten Modells in allen untersuchten Lappen im distalen Bereich eine Nekrose entwickelte. Dementsprechend gibt es über den Beobachtungszeitraum keine Veränderung der Werte im distalen Bereich.

4.1 Perfusionsausfall und Nekrose

Da zu Beginn des Beobachtungszeitraums nicht durchblutete Bereiche des Lappens noch nicht nekrotisch sind, spricht man zunächst von einem Perfusionsausfall, der im Lauf des Beobachtungszeitraums in eine Nekrose übergeht. Die unbehandelte Gruppe zeigte am ersten Tag nach Lappenhebung einen Perfusionsausfall von etwa 40% (siehe Abb. 5), der auf Grund der anhaltenden Ischämie im Zeitverlauf zu einer Nekrosefläche von circa 60% an Tag 10 führte. Die Behandlung mit dem EPO-high-Schema führte zu keiner Reduktion der Nekroserate. Die EPO-high-Tiere zeigten einen Perfusionsausfall von 55% an Tag 1, und eine Nekroserate von 60% an Tag 10 (siehe Abb. 5) und unterschieden sich nicht von den Kontrolltieren. Im Unterschied hierzu führte die Behandlung mit dem EPO-low-Schema zu einer ab Tag 3 signifikanten Verminderung der Nekroserate mit einem Perfusionsausfall von nur 30% an Tag 1 und einer Nekroserate von 35% an Tag 10 (siehe Abb. 5).

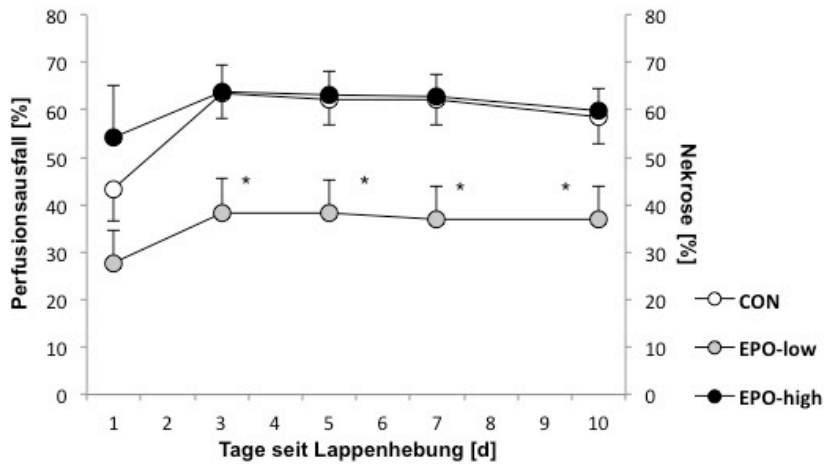


Abbildung 5: Perfusionsausfall/Nekroserate

Nekrosefläche in % der gesamten Lappenfläche von unbehandelten Tieren (CON) sowie Tieren mit konstant niedrigen EPO Dosierungen (EPO-low) und Tieren mit initial hohen EPO Dosierungen (EPO-high) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung. Da der Perfusionsausfall langsam in Nekrose übergeht wurden zwei y-Achsen verwendet; * = $p < 0,05$ vs. CON

4.2 Hämatokrit

In den am OP-Tag (Tag 0) gewonnenen Blutproben zeigten sich keine relevanten Unterschiede zwischen den Hämatokritwerten der Gruppen, alle Tiere wiesen Werte von ca. 40% auf. Diese Werte wurden als Baseline (BL) für die weitere Beobachtung verwendet und gleich 100% gesetzt. Im Bezug auf die BL zeigten die Kontrolltiere einen leichten Abfall des Hämatokrits auf 90% an Tag 10 (siehe Abb. 6). In der EPO-Hochdosisgruppe hingegen stieg der Hämatokrit bis Tag 10 auf 130% der BL an (siehe Abb. 6), ein signifikant größerer Wert als in der Kontrollgruppe. Ein weniger starker Anstieg auf 115% der BL an Tag 10 wurde in der EPO-Niedrigdosisgruppe verzeichnet (siehe Abb. 6).

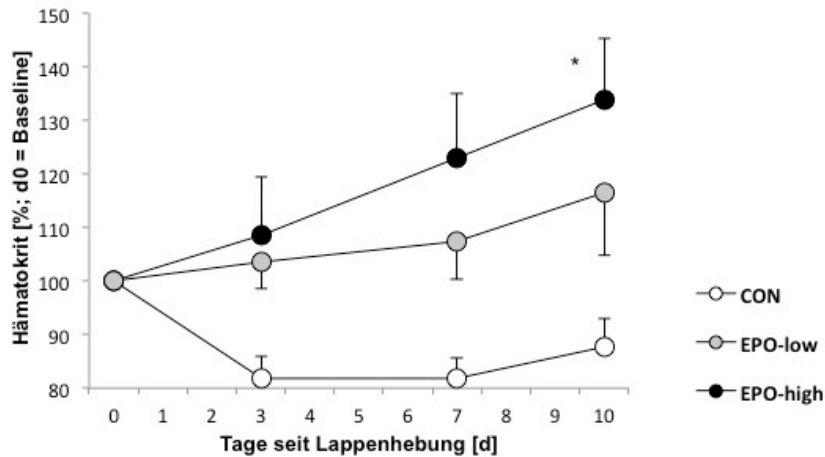


Abbildung 6: Hämatokrit

Entwicklung der Hämatokritwerte in % im Bezug auf die Baseline-Werte (d0) von unbehandelten Tieren (CON) sowie Tieren mit konstant niedrigen EPO Dosierungen (EPO-low) und Tieren mit initial hohen EPO Dosierungen (EPO-high) an den Tagen 0, 3, 7 und 10; * = $p < 0,05$ vs. CON.

4.3 Gefäßdurchmesser

4.3.1 Arterieller Gefäßdurchmesser

Der arterielle Durchmesser der EPO-low-Tiere lag sowohl in der Lappenbasis als auch in der Transitionszone relativ konstant über dem der Kontrolltiere und der EPO-high-Tiere, wobei der Unterschied im proximalen Bereich ausgeprägter war (siehe Abb. 7A und B). Von Interesse ist, dass die Kontrolltiere im Verlauf (Tag 3 bis Tag 7) einen deutlichen Anstieg des Gefäßdurchmessers aufwiesen, der allerdings erst nach der Demarkation der Nekrose (ca. Tag 3) auftrat (siehe Abb. 7A).

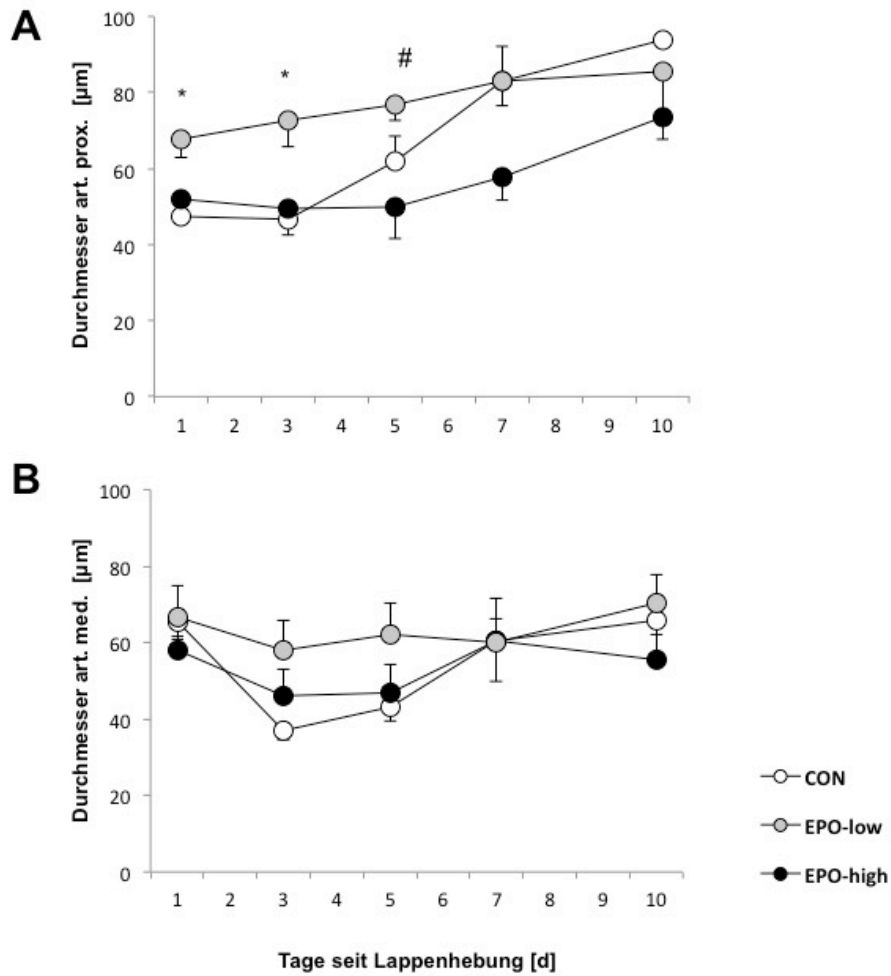


Abbildung 7: Arterieller Gefäßdurchmesser

Messungen in μm im proximalen (A) und medialen (B) Teil der Hautkammer von unbehandelten Tieren (CON), sowie Tieren mit konstant niedrigen EPO Dosierungen (EPO-low) und Tieren mit initial hohen EPO Dosierungen (EPO-high) an den Tagen 1, 3, 5, 7 und 10 nach Lappenhebung; * = $p < 0,05$ vs. CON; # = $p < 0,05$ vs. EPO-high.

4.3.2 Venöser Gefäßdurchmesser

Bezüglich des venösen Durchmessers ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (siehe Abb. 8A und B). Tendenziell wiesen die Tiere der EPO-Niedrigdosisgruppe höhere Werte auf, die vor allem in der Lappenbasis konstant über denen der anderen Gruppen lagen (siehe Abb. 8A).

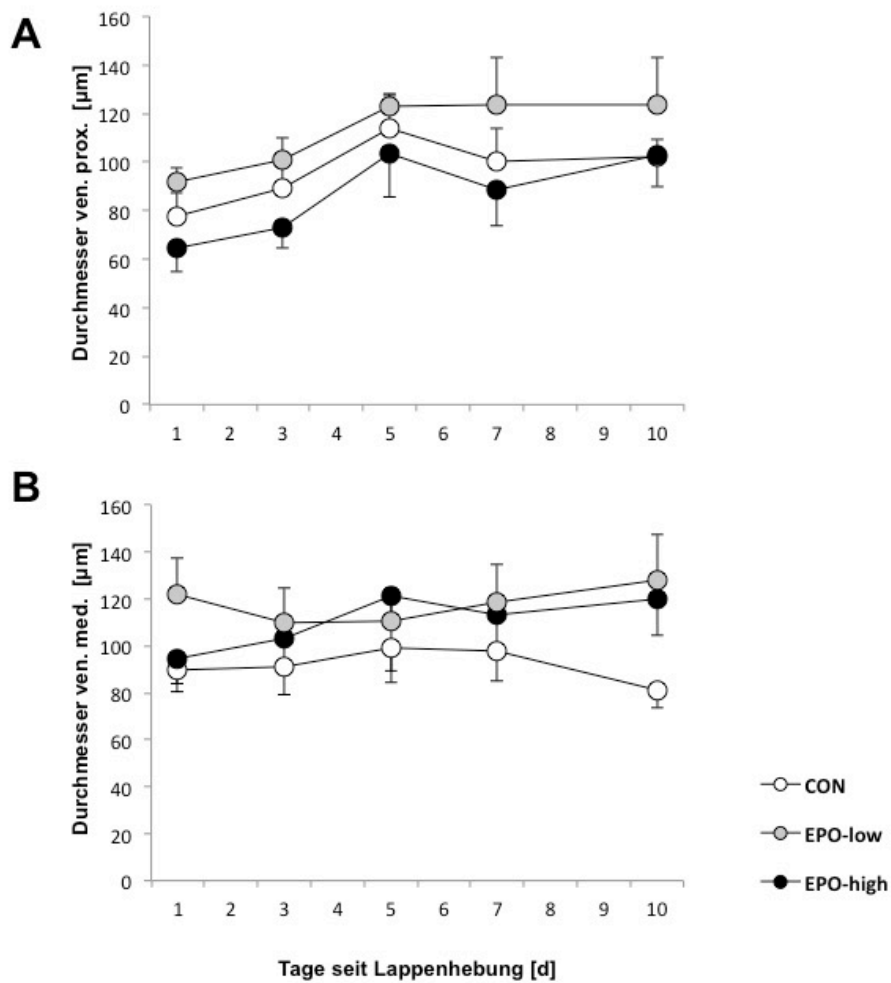


Abbildung 8: Venöser Gefäßdurchmesser

Messungen in µm im proximalen (A) und medialen (B) Teil der Hautkammer von unbehandelten Tieren (CON), sowie Tieren mit konstant niedrigen EPO Dosierungen (EPO-low) und Tieren mit initial hohen EPO Dosierungen (EPO-high) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung.

4.3.3 Kapillärer Gefäßdurchmesser

Der durchschnittliche kapilläre Durchmesser aller Gruppen nahm über den Beobachtungszeitraum von 6-7µm auf 10-12µm zu. Der Kurvenverlauf war hierbei in allen Bereichen und allen Gruppen annähernd gleich (siehe Abb. 9A und B). Der Durchmesser der Kapillaren im proximalen Bereich des Lappens war am Tag 10 in der EPO-Hochdosisgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (siehe Abb. 9A).

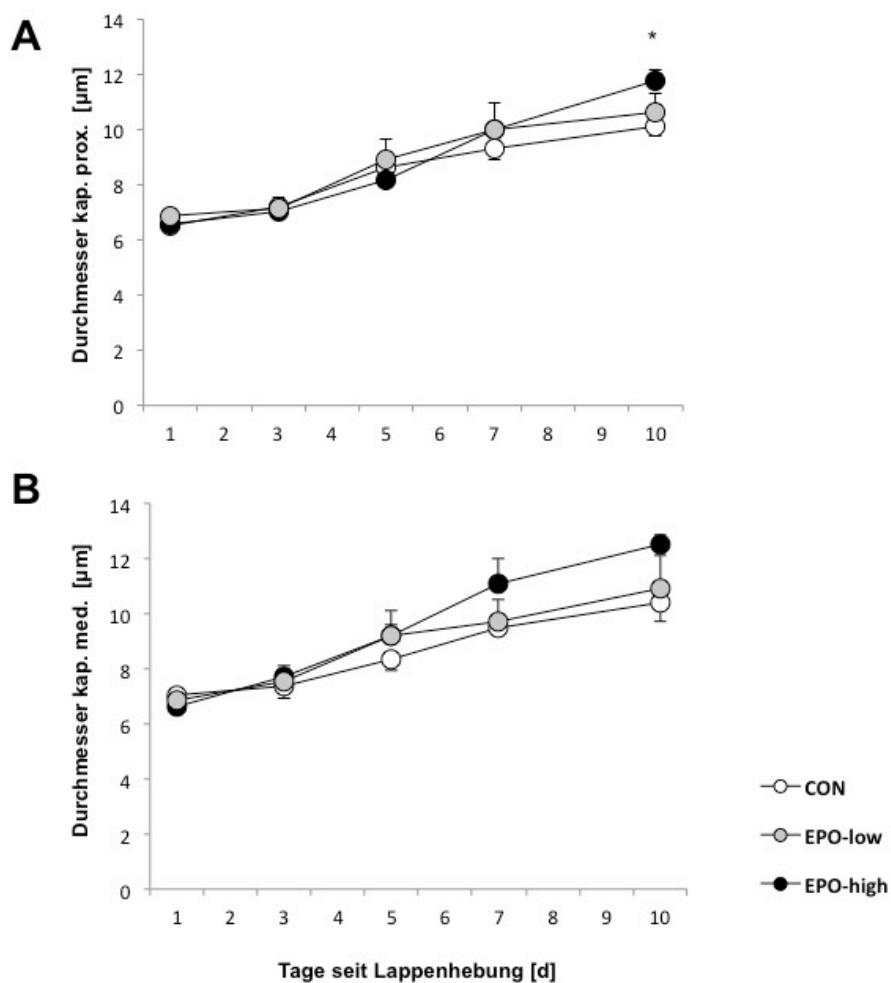


Abbildung 9: Kapillärer Gefäßdurchmesser

Messungen in µm im proximalen (A) und medialen (B) Teil der Hautkammer von unbehandelten Tieren (CON), sowie Tieren mit konstant niedrigen EPO Dosierungen (EPO-low) und Tieren mit initial hohen EPO Dosierungen (EPO-high) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung; * = $p < 0,05$ vs. CON.

4.4 Fließgeschwindigkeit

4.4.1 Arterielle Fließgeschwindigkeit

Sowohl in der proximalen als auch in der medialen Beobachtungszone lag die arterielle Fließgeschwindigkeit der EPO-low-Tiere über der der anderen Gruppen (siehe Abb. 10A und B). Besonders deutlich war der Unterschied zwischen den Gruppen in der medialen, kritisch perfundierten Zone (siehe Abb. 10B). Hier lag die Fließgeschwindigkeit der EPO-low-Tiere bei etwa 0,6-0,7 mm/s, während sowohl die Kontrollgruppe als auch die EPO-Hochdosisgruppe deutlich niedrigere Werte von 0,2-0,3 mm/s aufwiesen. Der Unterschied zwischen EPO-low und Kontrollgruppe war an den Tagen 3 und 5 signifikant, an Tag 7 bestand außerdem ein signifikanter Unterschied zur EPO-high Gruppe. Von Interesse ist zudem, dass es in der Kontrollgruppe zwischen Tag 3 und Tag 7, also nach der Demarkierung der Nekrose zu einem deutlichen Anstieg der Fließgeschwindigkeit kam (siehe Abb. 10B).

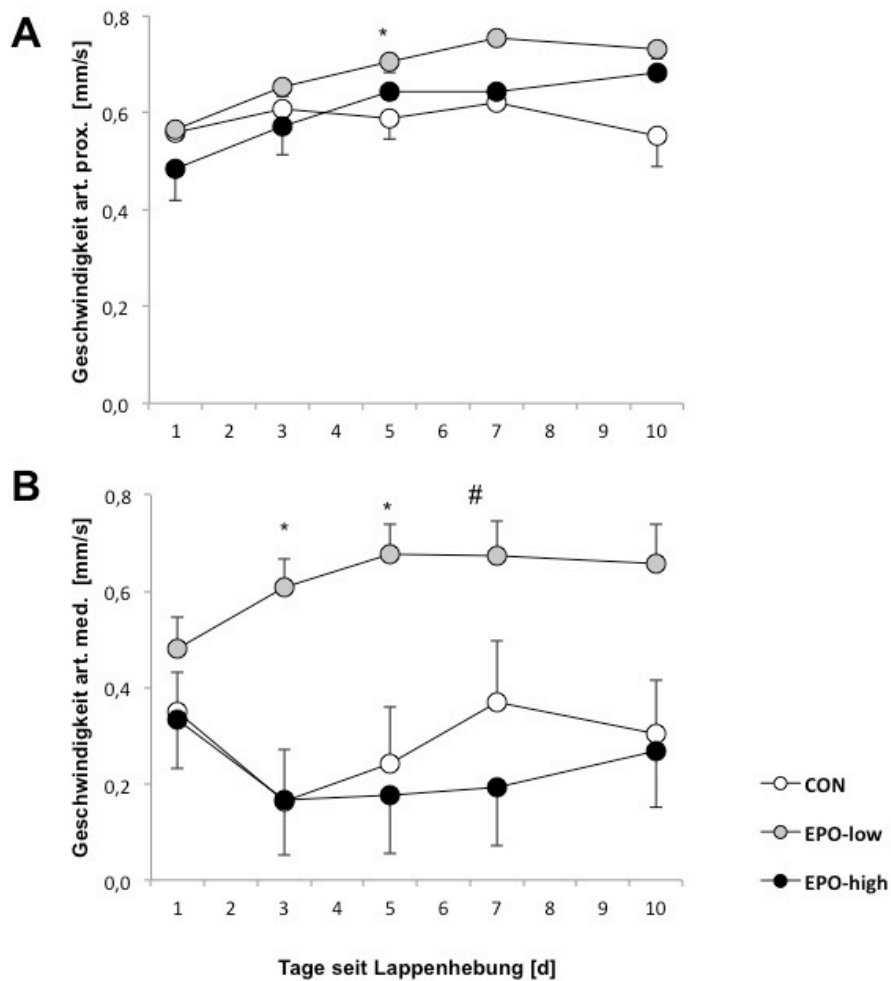


Abbildung 10: Arterielle Fließgeschwindigkeit
 Arterielle Fließgeschwindigkeit in mm/s im proximalen (A) und medialen (B) Teil der Hautkammer von unbehandelten Tieren (CON) sowie Tieren mit konstant niedrigen EPO Dosierungen (EPO-low) und Tieren mit initial hohen EPO Dosierungen (EPO-high) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung; * = $p < 0,05$ vs. CON; # = $p < 0,05$ vs. EPO-high.

4.4.2 Venöse Fließgeschwindigkeit

In der proximalen Beobachtungszone unterschieden sich die venösen Fließgeschwindigkeiten kaum (siehe Abb. 11A). In der medialen, kritischen Zone lag die Fließgeschwindigkeit der EPO-low-Tiere mit Werten von ca. 0,4 mm/s tendenziell über den Fließgeschwindigkeiten der anderen Gruppen. Der Unterschied zur EPO-Hochdosisgruppe war an Tag 1 signifikant (siehe Abb. 11B).

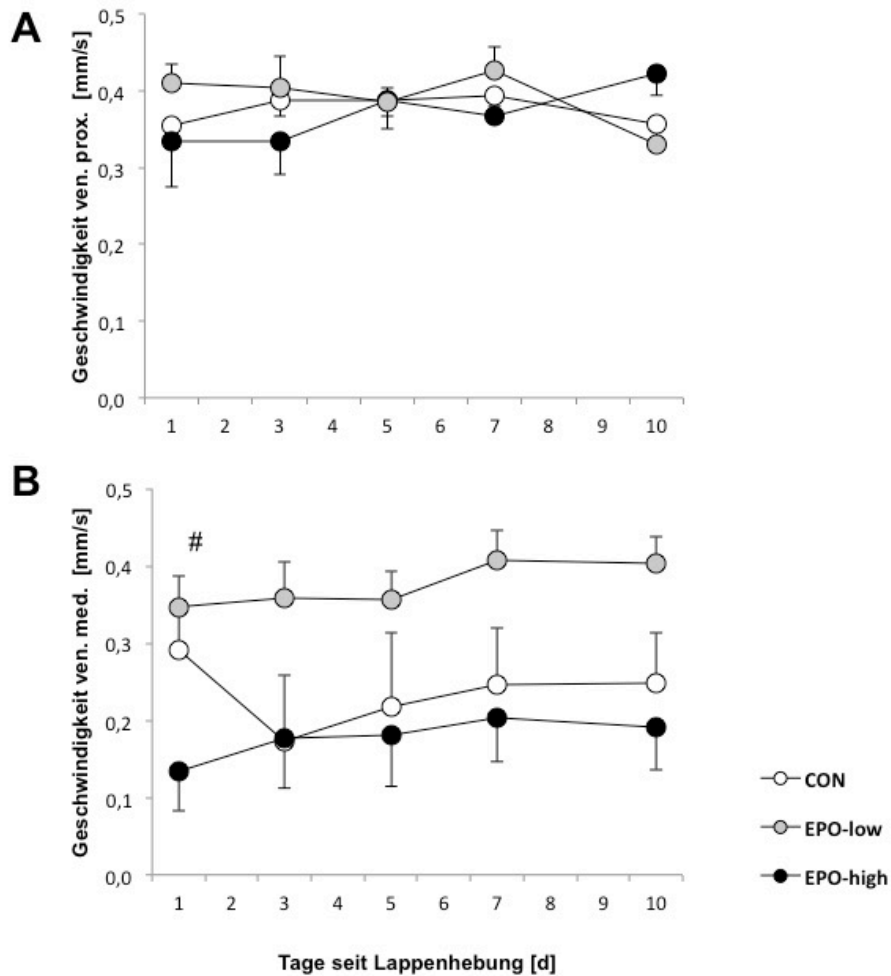


Abbildung 11: Venöse Fließgeschwindigkeit

Venöse Fließgeschwindigkeit in mm/s im proximalen (A) und medialen (B) Teil der Hautkammer von unbehandelten Tieren (CON) sowie Tieren mit konstant niedrigen EPO Dosierungen (EPO-low) und Tieren mit initial hohen EPO Dosierungen (EPO-high) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung; # = $p < 0,05$ vs. EPO-high

4.4.3 Kapilläre Fließgeschwindigkeit

Sowohl in der proximalen als auch in der medialen Beobachtungszone lag die kapilläre Fließgeschwindigkeit der EPO-low-Tiere über der der anderen Gruppen (siehe Abb. 12A und B). Besonders deutlich ist der Unterschied zwischen den Gruppen in der medialen, kritisch perfundierten Zone. Während die Kapillaren der Kontrolltiere und der EPO-Hochdosistiere hier Fließgeschwindigkeiten von ca. 0,1-0,15 mm/s aufwiesen, wurden in der EPO-Niedrigdosisgruppe Werte von 0,2-0,3 mm/s gemessen (siehe Abb. 12B). Der

Unterschied zur Kontrollgruppe war hierbei an Tag 3 signifikant, zusätzlich war der Unterschied zur EPO-Hochdosisgruppe an den Tagen 5-10 signifikant.

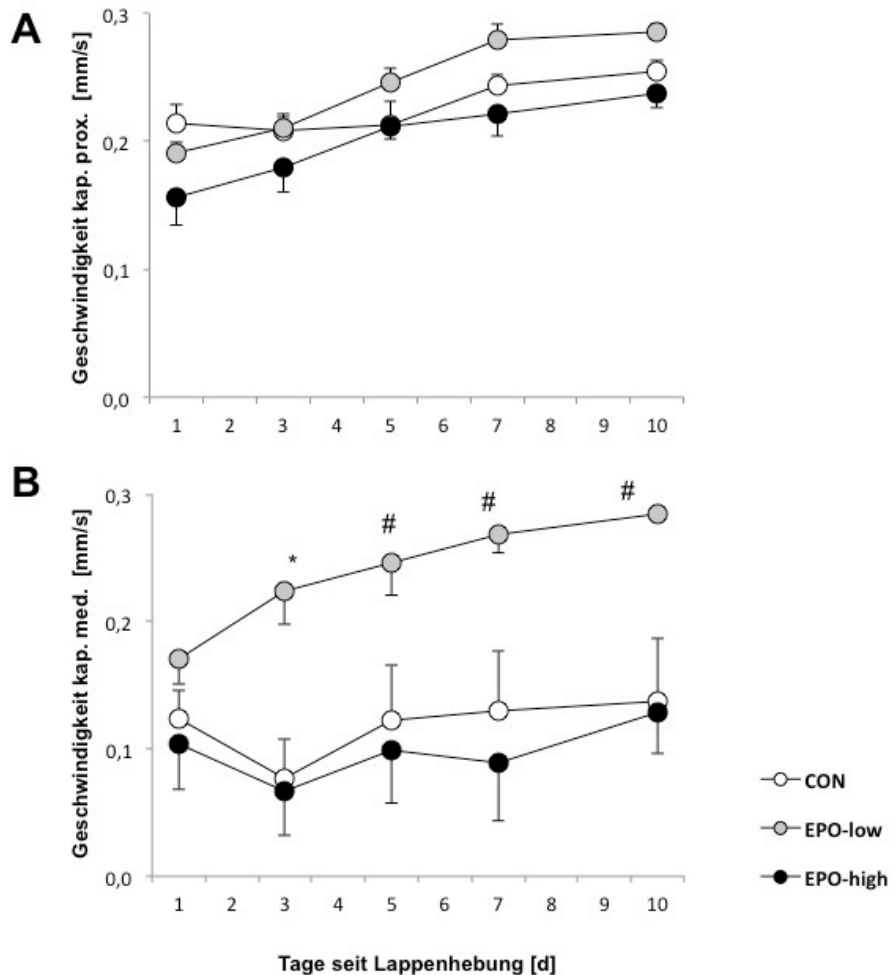


Abbildung 12: Kapilläre Fließgeschwindigkeit
 Kapilläre Fließgeschwindigkeit in mm/s im proximalen (A) und medialen (B) Teil der Hautkammer von unbehandelten Tieren (CON) sowie Tieren mit konstant niedrigen EPO Dosierungen (EPO-low) und Tieren mit initial hohen EPO Dosierungen (EPO-high) an den Tagen 1, 3, 5, 7 und 10 nach Lappenhebung; * = $p < 0,05$ vs. CON; # = $p < 0,05$ vs. EPO-high.

4.5 Blutfluss

4.5.1 Arterieller Blutfluss

Der arterielle Blutfluss der EPO-low-Tiere lag sowohl in der Lappenbasis, als auch in der kritischen medialen Zone über dem der beiden anderen Gruppen.

Die Unterschiede zur Kontrollgruppe waren hierbei in der proximalen Zone an

Tag 1 und Tag 3 signifikant (siehe Abb. 13A) und in der medialen Zone an Tag 3 und Tag 5 (siehe Abb. 13B). In der proximalen Zone war des Weiteren an Tag 5 der Unterschied der EPO-low Gruppe zur EPO-high signifikant. In der Lappenbasis ließ sich in allen drei Gruppen ein Anstieg des Blutflusses über den Beobachtungszeitraum nachweisen. Von Interesse ist außerdem, dass sowohl in der proximalen als auch in der medialen Zone des Lappens zwischen Tag 3 und Tag 7, also nach der Demarkierung der Nekrose, ein besonders steiler Anstieg in der Kontrollgruppe zu beobachten war, der das Gewebeüberleben nicht mehr beeinflussen konnte (siehe Abb. 13A und B).

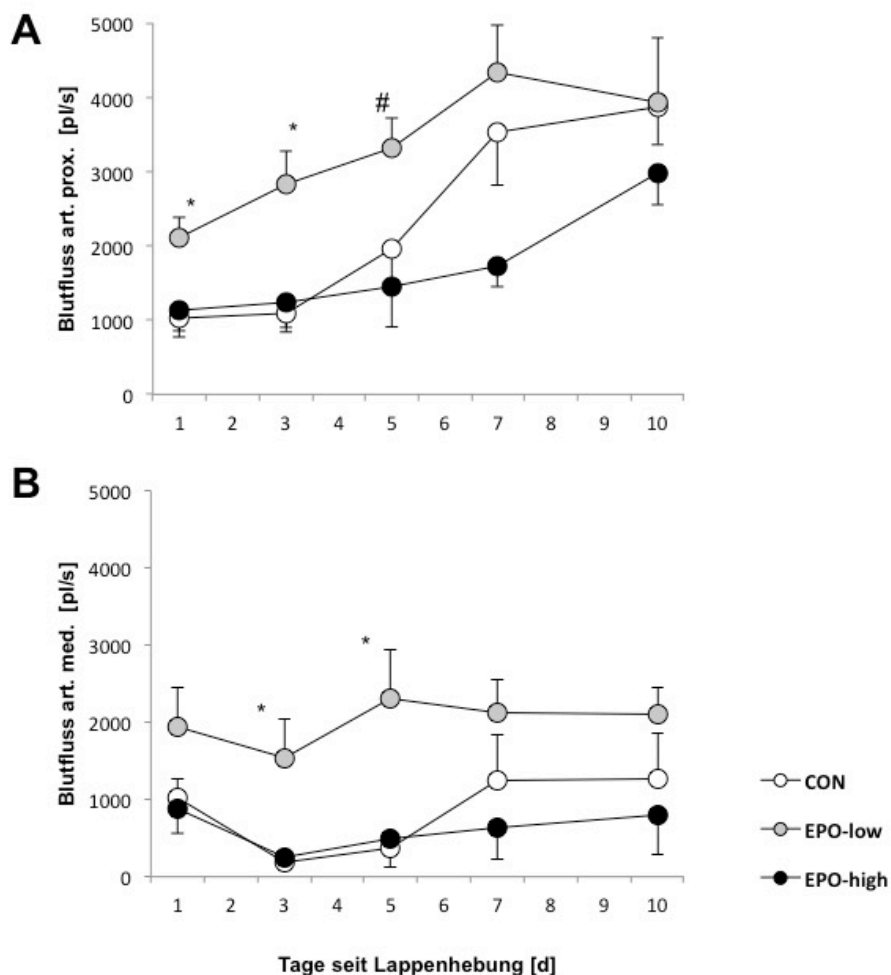


Abbildung 13: Arterieller Blutfluss

Arterieller Blutfluss in p/s im proximalen (A) und medialen (B) Teil der Hautkammer von unbehandelten Tieren (CON) sowie Tieren mit konstant niedrigen EPO Dosierungen (EPO-low) und Tieren mit initial hohen EPO Dosierungen (EPO-high) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung; * = $p < 0,05$ vs. CON; # = $p < 0,05$ vs. EPO-high.

4.5.2 Venöser Blutfluss

Korrespondierend zum arteriellen Einfluss in den Lappen ist der venöse Abfluss der EPO-Niedrigdosisgruppe tendenziell höher im Vergleich zu den beiden anderen Versuchsgruppen, der Unterschied ist hierbei allerdings nicht signifikant (siehe Abb. 14A und B). In der Lappenbasis ist außerdem ein Anstieg des venösen Blutflusses über den Beobachtungszeitraum in allen drei Gruppen zu beobachten (siehe Abb. 14A). An Tag 1 unterschied sich der venöse Blutfluss der EPO-Niedrigdosisgruppe signifikant von dem der EPO-Hochdosisgruppe.

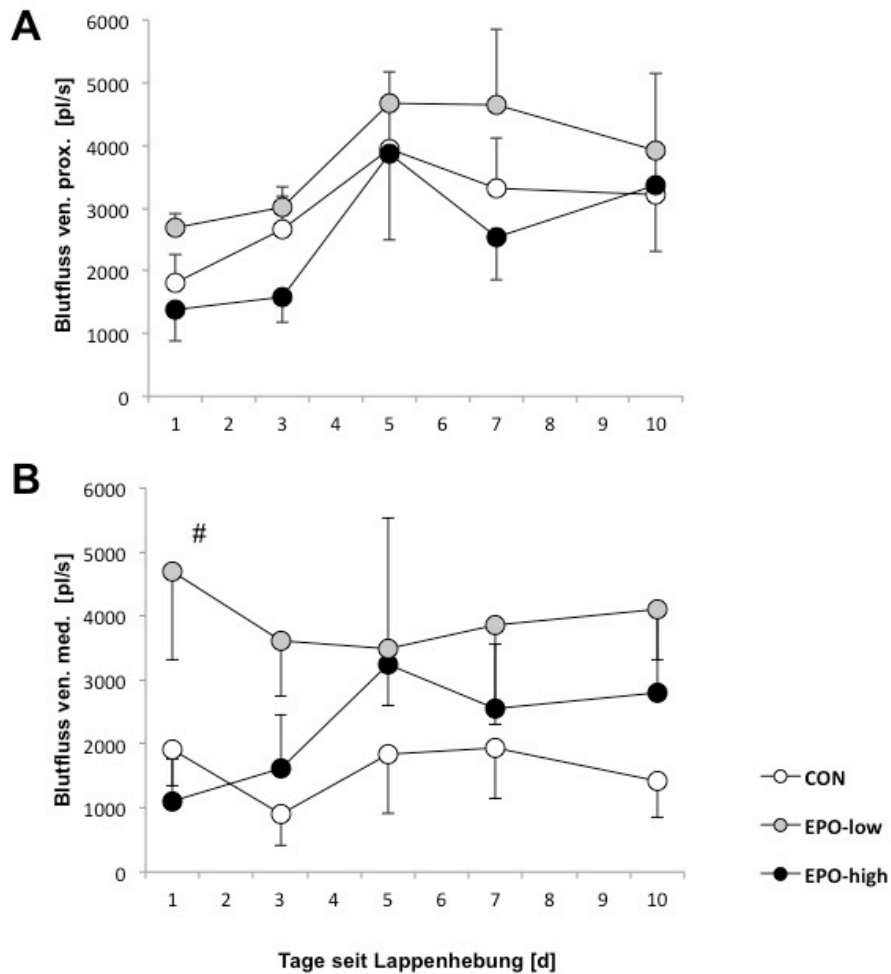


Abbildung 14: Venöser Blutfluss

Venöser Blutfluss in pl/s im proximalen (A) und medialen (B) Teil der Hautkammer von unbehandelten Tieren (CON) sowie Tieren mit konstant niedrigen EPO Dosierungen (EPO-low) und Tieren mit initial hohen EPO Dosierungen (EPO-high) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung; # = $p < 0,05$ vs. EPO-high.

4.5.3 Kapillärer Blutfluss

In der proximalen und medialen Zone konnten man in allen drei Gruppen eine Zunahme des kapillären Blutflusses von 5 pl/s auf bis zu 25pl/s beobachten (siehe Abb. 15A und B). In der medialen, kritischen Beobachtungszone lagen die Werte der EPO-Niedrigdosisgruppe hierbei leicht über den Werten der anderen beiden Versuchsgruppen (siehe Abb. 15B). Der Unterschied der EPO-Niedrigdosisgruppe zu den anderen beiden Gruppen war an Tag 3 signifikant.

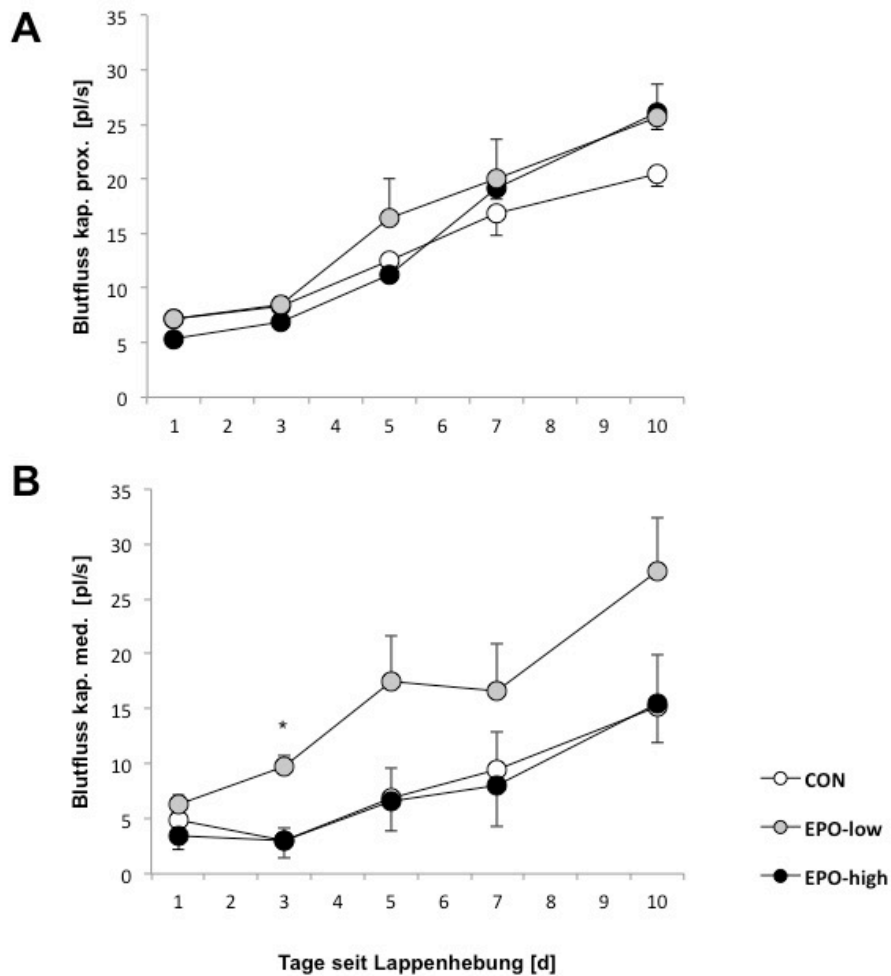


Abbildung 15: Kapillärer Blutfluss

Kapillärer Blutfluss in pl/s im proximalen (A) und medialen (B) Teil der Hautkammer von unbehandelten Tieren (CON) sowie Tieren mit konstant niedrigen EPO Dosierungen (EPO-low) und Tieren mit initial hohen EPO Dosierungen (EPO-high) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung; * = $p < 0,05$ vs. CON.

4.6 Funktionelle Kapillardichte

Die Funktionelle Kapillardichte (FCD) der EPO-low-Tiere lag in der proximalen und medialen Zone des Haut-Muskellappens über der FCD der anderen Gruppen. Hierbei wiesen die EPO-low-Tiere einen leichten Abwärtstrend auf, der in den anderen Gruppen weniger ausgeprägt war (siehe Abb. 16A und B). In der proximalen Lappenzone war der Unterschied zwischen der EPO-Niedrigdosisgruppe und der EPO-Hochdosisgruppe an Tag 1 signifikant, der Unterschied zur Kontrollgruppe an Tag 3 (siehe Abb. 16A).

Besonders deutlich ausgeprägt war der Unterschied zwischen der EPO-Niedrigdosisgruppe und den anderen beiden Gruppen in der medialen Zone des Haut-Muskel-Lappens. Mit 200-250 cm/cm² waren in der EPO-Niedrigdosisgruppe etwa doppelt so viele Kapillaren pro Fläche durchblutet wie in den anderen beiden Gruppen, in denen die Tiere Werte von ca. 100 cm/cm² aufwiesen. Die Unterschiede zu den anderen Gruppen waren hierbei ab Tag 3 statistisch signifikant (siehe Abb. 16B).

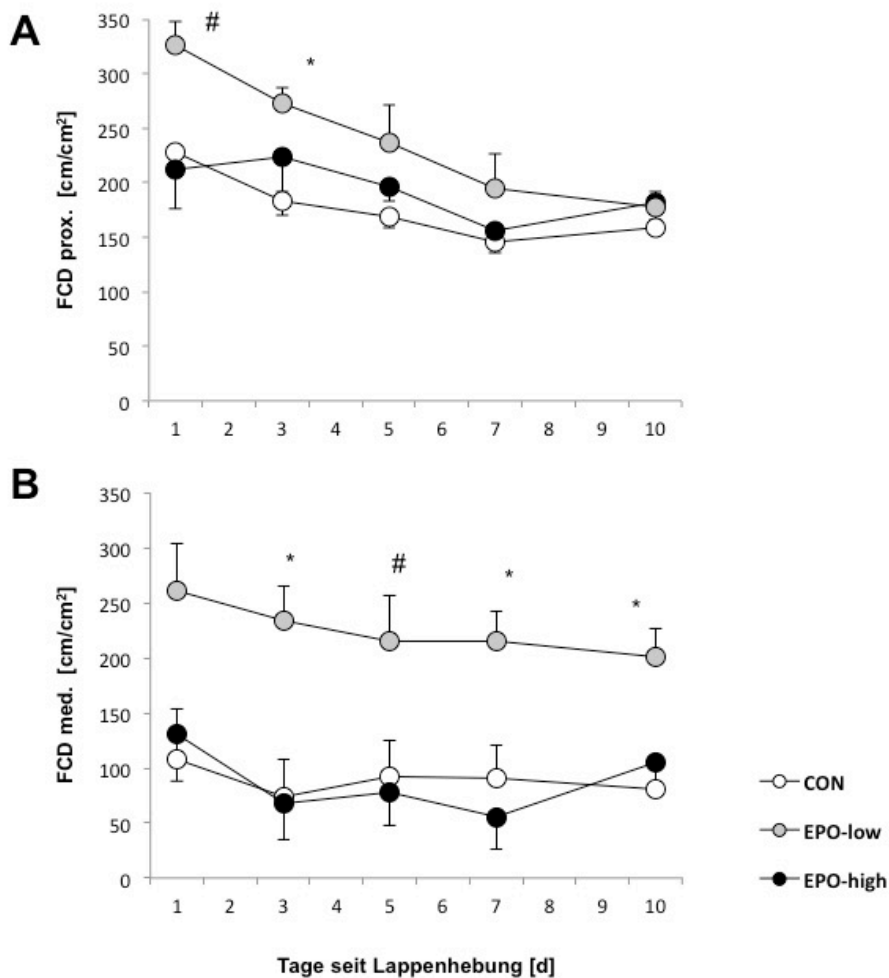


Abbildung 16: Funktionelle Kapillardichte
 Funktionelle Kapillardichte in cm/cm² im proximalen (A) und medialen (B) Teil der Hautkammer von unbehandelten Tieren (CON) sowie Tieren mit konstant niedrigen EPO Dosierungen (EPO-low) und Tieren mit initial hohen EPO Dosierungen (EPO-high) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung; * = p < 0,05 vs. CON; # = p < 0,05 vs. EPO-high.

4.7 Kapilläre Tortuosität

Der Tortuositäts-Index der EPO-low-Tiere lag in allen drei Zonen des Lappens mit 1,07 konstant über dem der anderen beiden Gruppen mit ca. 1,04. Der Unterschied zur Kontrollgruppe war hierbei in der proximalen Zone an den Tagen 1 bis 7 signifikant, in der medialen Zone von Tag 3 bis Tag 7 (siehe Abb. 17A und B).

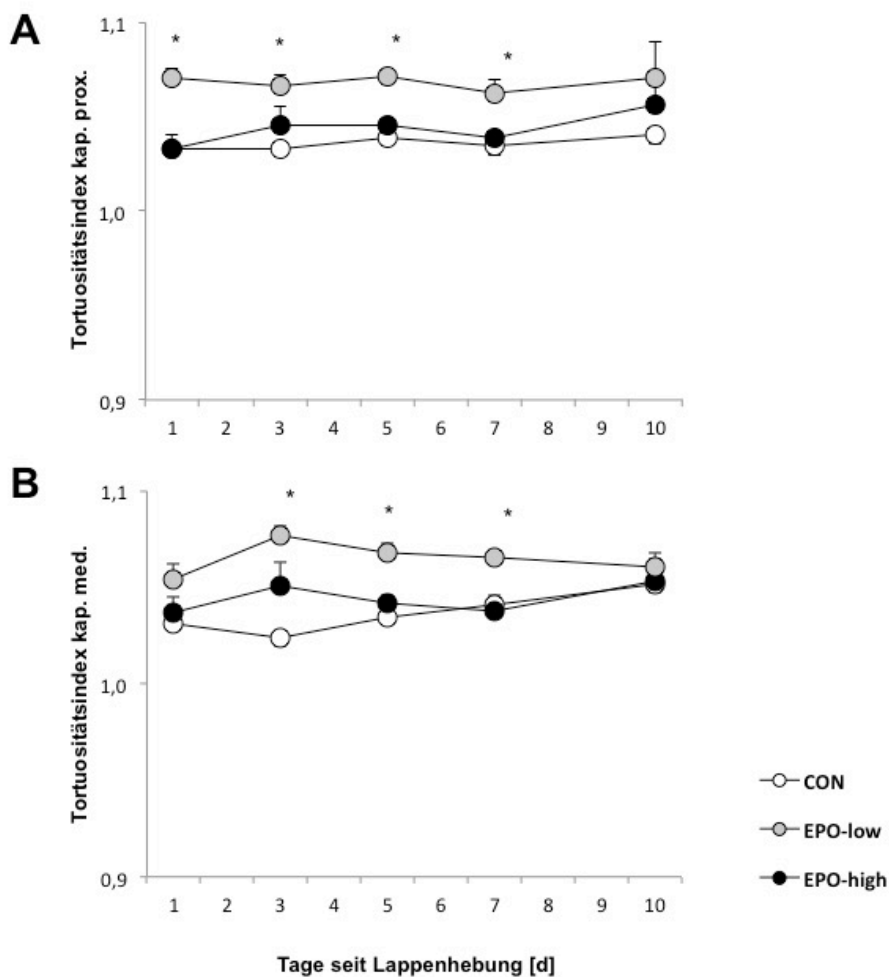


Abbildung 17: Tortuositätsindex

Tortuositätsindex (gewundene Strecke/ minimale Strecke) im proximalen (A) und medialen (B) Teil der Hautkammer von unbehandelten Tieren (CON) sowie Tieren mit konstant niedrigen EPO Dosierungen (EPO-low) und Tieren mit initial hohen EPO Dosierungen (EPO-high) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung; * = $p < 0,05$ vs. CON; ** = $p < 0,05$ vs. CON und EPO-high.

4.8 Neoangiogenese

In der Kontrollgruppe konnten nur minimale Gefäßneubildungen gegen Ende des Beobachtungszeitraums nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu konnte man in beiden mit EPO behandelten Gruppen vermehrt Gefäßneubildungen in der Übergangszone zwischen vitalem und nekrotischem Gewebe beobachten. Bis Tag 5 verlief der Anstieg der Neoangiogenese in den beiden EPO-Gruppen ähnlich, während die EPO-high Gruppe jedoch ein Plateau von Tag 5 bis Tag 7 zu verzeichnen hatte, stieg die EPO-low Gruppe auch in diesem Zeitraum stetig an. Der Unterschied zwischen der Niedrigdosisgruppe und der Kontrollgruppe war hierbei an den Tagen 7 und 10 statistisch signifikant (siehe Abb. 18).

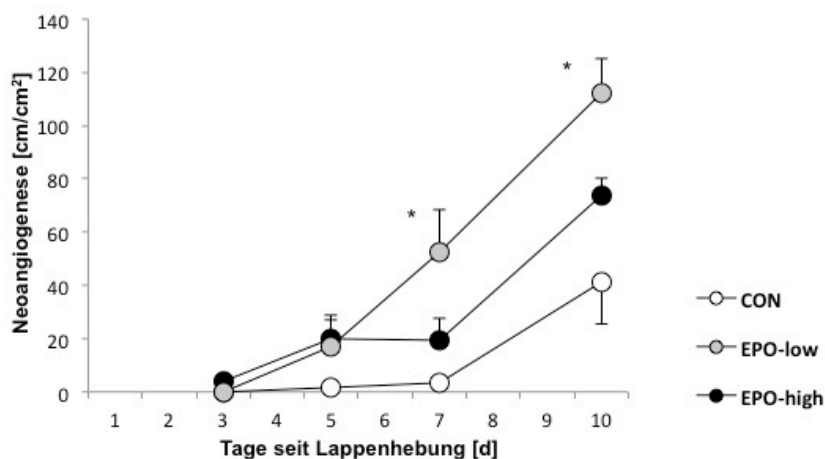


Abbildung 18: Neoangiogenese

Gefäßneubildungen in cm/cm^2 gemessen bei unbehandelten Tieren (CON) sowie Tieren mit konstant niedrigen EPO Dosierungen (EPO-low) und Tieren mit initial hohen EPO Dosierungen (EPO-high) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung; * = $p < 0,05$ vs. CON.

4.9 Leukozyten

Wir beobachteten in allen Kammern eine entzündliche Reaktion, die auf die chirurgische Präparation des Lappens zurückzuführen ist. Es waren hierbei weder in den arteriellen noch in den venösen Gefäßen klare Trends oder

Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich den der Gefäßwand anhaftenden oder den rollenden Leukozyten festzustellen.

4.10 Apoptose

Sowohl in der proximalen Zone als auch in der medialen Zone aller Versuchsgruppen war bis Tag 5 eine Abnahme der apoptotischen Zellen pro mm^2 zu beobachten. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden nicht gemessen, allerdings lag die Anzahl der Apoptosen in der EPO-Niedrigdosisgruppe an Tag 1 sowohl in der proximalen, als auch in der medialen Zone unter der Anzahl der beiden anderen Gruppen (siehe Abb. 19A und B).

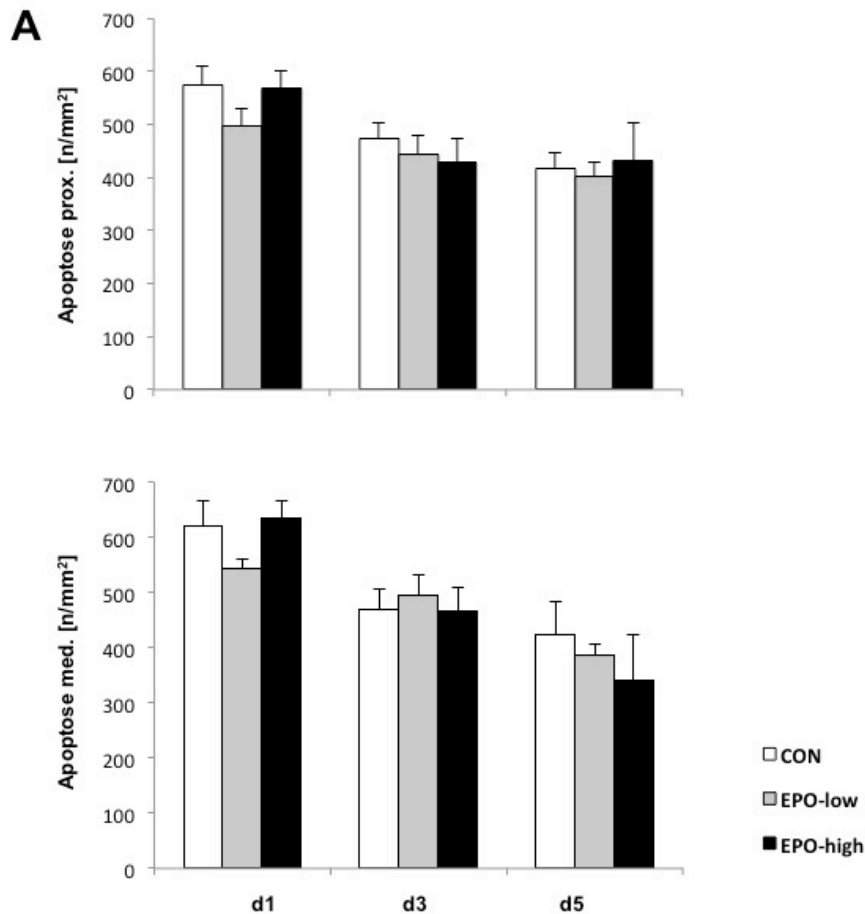


Abbildung 19: Apoptose

Anzahl der Apoptosen in n/mm² im proximalen (A) und medialen (B) Teil der Hautkammer von unbehandelten Tieren (CON) sowie Tieren mit konstant niedrigen EPO Dosierungen (EPO-low) und Tieren mit initial hohen EPO Dosierungen (EPO-high) 1, 3 und 5 Tage nach Lappenhebung.

4.11 Histologie

4.11.1 eNOS

In den angefertigten Gewebeschnitten zeigten sowohl die Tiere der EPO-Niedrigdosisgruppe (Abb. 20B) als auch der EPO-Hochdosisgruppe (Abb. 20C) eine deutlich intensivere Färbung als die Tiere der Kontrollgruppe (Abb. 20A). In allen Gruppen konnte außerdem ein Anstieg der eNOS-Expression von Tag 0 auf Tag 10 beobachtet werden (siehe Abb. 20D), wobei die Werte der mit EPO behandelten Gruppen über den Werten der Kontrollgruppe lagen. Die Gewebeproben der EPO-Niedrigdosisgruppe wiesen die höchste Expression

von eNOS auf, allerdings konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

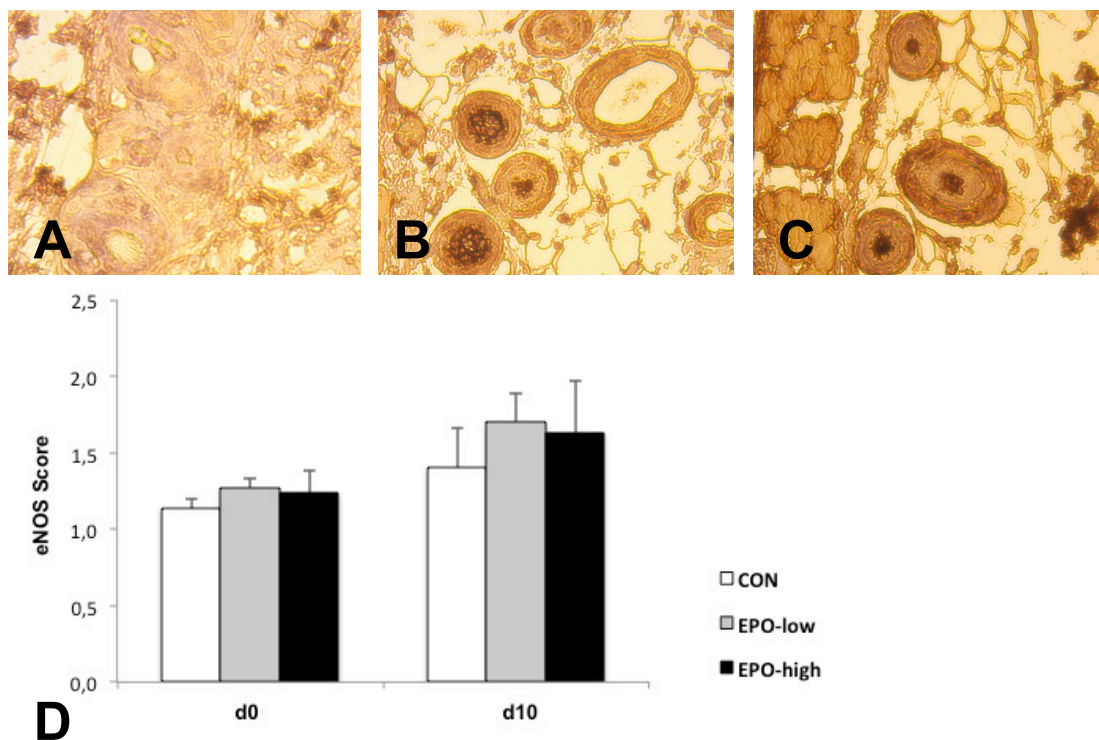


Abbildung 20: Immunhistologie eNOS
Aufnahmen der immunhistologischen Schnitte für eNOS an Tag 0 der Kontrollgruppe (CON; A), der EPO-Niedrigdosisgruppe (EPO-low; B) und der EPO-Hochdosisgruppe (EPO-high; C); Darstellung der Score-Auswertung der Proben von Tag 0 und Tag 10 (D).

4.11.2 VEGF

In den Gewebeproben der Kontrollgruppe (Abb. 21A) zeigte sich eine geringere Färbung als in den Proben der EPO-Niedrigdosisgruppe (Abb. 21B) und der EPO-Hochdosisgruppe (Abb. 21C). In den mit EPO behandelten Gruppen konnte ein Anstieg der Expression von VEGF zwischen Tag 0 und Tag 10 beobachtet werden. Im Gegensatz dazu stieg die VEGF-Expression in der Kontrollgruppe weniger stark an (siehe Abb. 21D). Die Werte der mit EPO behandelten Gruppen lagen insgesamt über den Werten der Kontrollgruppe, die jeweils höchsten Werte wurden in der EPO-Hochdosisgruppe gemessen, wobei die Unterschiede nicht signifikant waren. Interessant war der geringe

Unterschied zwischen beiden mit EPO behandelten Gruppen. Die Scores der mit EPO behandelten Gruppen unterschieden sich kaum, wohingegen der Unterschied zum Score der Kontrollgruppe deutlich ausgeprägter war (siehe Abb. 21D).

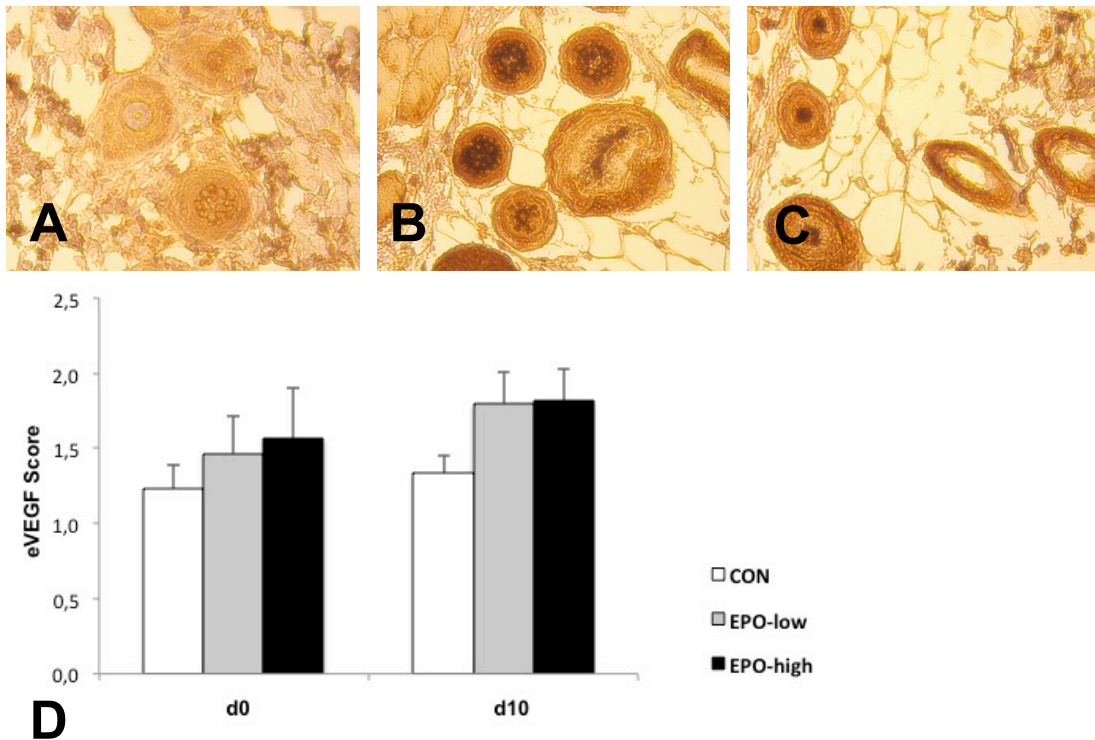


Abbildung 21: Immunhistologie VEGF
 Aufnahmen der immunhistologischen Schnitte für VEGF an Tag 0 der Kontrollgruppe (CON; A), der EPO-Niedrigdosisgruppe (EPO-low; B) und der EPO-Hochdosisgruppe (EPO-high; C); Darstellung der Score-Auswertung der Proben von Tag 0 und Tag 10 (D).

5. Diskussion

Die vorliegende Studie evaluiert den Nutzen von systemisch verabreichtem Erythropoetin zur Verhinderung Ischämie-bedingter Komplikationen. Den Versuchstieren wurde sowohl vor, als auch nach der Hebung eines randomisiert perfundierten Haut-Muskel-Lappens EPO in zwei verschiedenen Dosierungsschemata verabreicht. Das Gewebe wurde also sowohl der Prä- als auch der Postkonditionierung unterzogen. Die unbehandelten Lappen der Kontrollgruppe entwickelten eine Nekroserate von etwa 60%.

Um die Mikrozirkulation des Lappens wiederholt mittels Intravitalfluoreszenzmikroskopie untersuchen zu können wurde der Lappen in eine Rückenhautkammer eingebracht. Das kritisch perfundierte Gewebe konnte so an den Tagen 1, 3, 5, 7 und 10 nach der Lappenhebung mittels Intravitalfluoreszenzmikroskopie bezüglich der Mikrozirkulation und der Ausbildung von Gewebsnekrosen untersucht werden. Aufgezeichnet wurden Nekrosefläche, Durchmesser, Fließgeschwindigkeit und Blutfluss in Arteriolen, Venulen und Kapillaren, funktionelle Kapillardichte, Kapillartortuosität, Neoangiogenese, Apoptose und Leukozyten-Endothelzellinteraktion. Unabhängig davon wurden laborchemisch der Hämatokrit- und Hb-Wert bestimmt und die Expression von eNOS und VEGF immunhistologisch untersucht.

Die Erkenntnisse der Intravitalmikroskopie der Haut-Muskel-Lappen im Rückenhautkammermodell der Maus erlaubten detaillierte Aussagen über die verschiedenen Wirkungen von Erythropoetin auf das kritisch perfundierte, ischämische Haut-Muskel-Gewebe, welche im Folgenden diskutiert werden.

5.1 Nekrose

Die mikroskopische Analyse der Hautlappen im Verlauf der 10-tägigen Versuchsdauer zeigten im medialen, kritisch durchbluteten Bereich des Lappens massive Veränderungen der Mikrozirkulation als Reaktion auf die plötzlich einsetzende, anhaltende Ischämie. Bis etwa Tag 3 entwickelte sich eine klare Demarkationslinie zwischen dem distalen, nekrotischen und dem proximalen, vitalen Gewebe. In allen drei Versuchsgruppen stieg dabei die Nekroserate zwischen Tag 1 und Tag 3 leicht an, bis sich die Nekrose endgültig demarkiert hatte und fiel gegen Ende der Beobachtungszeit minimal ab.

Der Anteil an vitalem Gewebe an der Gesamtfläche des Lappens lag in der EPO-Niedrigdosisgruppe ab Tag 3 signifikant höher als in den anderen Versuchsgruppen (siehe Abb. 5). Dies zeigt, dass wiederholte niedrige Dosen EPO von 125 I.E./kg KG, die vor und nach der Induktion der akuten persistierenden Ischämie verabreicht werden, in der Lage sind das Gewebeüberleben zu verbessern. Die Nekroserate der EPO-Hochdosisgruppe unterschied sich hingegen nicht von der Nekroserate der Kontrollgruppe. Harder et al. konnten in Vorarbeiten bereits zeigen, dass eine niedrigere Dosis von 500 I.E./kg KG alle 24 h der hohen Dosis von 5000 I.E./kg KG alle 24 h überlegen war. Die Autoren machten hierfür die durch den erhöhten Hämatokrit verschlechterte Rheologie verantwortlich. Die aktuelle Studie belegt nun, dass auch eine noch niedrigere Dosis von 125 I.E./kg KG alle 12 h effektiv das Gewebe vor Nekrose schützt. Die in der EPO-Hochdosisgruppe durchgeführte rasche Reduktion von 2500 I.E./kg KG vor der Lappenhebung auf die Hämatokrit-unwirksame Dosis von 125 I.E./kg KG innerhalb von 48 h war nicht ausreichend, um das Gewebeüberleben zu verbessern.

Ebenfalls von Interesse ist der leichte Abfall der Nekroserate in den Versuchsgruppen gegen Ende der Beobachtungszeit, der auf eine beginnende Geweberegeneration hindeuten könnte. Nakamura et al. gelang es EPO einen regenerativen Effekt auf intestinales Gewebe nachzuweisen (Nakamura et al., 2015) und auch in verschiedenen Arbeiten zum Thema Wundheilung zeigte EPO einen positiven Effekt auf die Geweberegeneration (Buemi et al., 2004; Haroon et al., 2003). Die mit rekombinantem human-EPO behandelten Gruppen zeigten in diesen Arbeiten erhöhte Wundheilungs-Parameter, wie zum Beispiel einen erhöhten Kollagen-Anteil im Gewebe. In Gewebelappen konnte ein solcher regenerativer Effekt bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden. In der vorliegenden Studie zeigten die Versuchstiere erst an Tag 10 einen beginnenden Abfall der Nekroserate, der zu gering war, um eine Aussage über einen möglichen Zusammenhang mit der Applikation von EPO zu machen.

Da die Auswirkungen von EPO auf die Geweberegeneration nicht Teil der zentralen Fragestellung der vorliegenden Studie waren und die Bildqualität der Intravitalmikroskopien auf Grund verschiedener Faktoren wie z.B. Gewebeödem mit der Zeit abnimmt, verwendeten wir eine Nachbeobachtungszeit von 10 Tagen. Ein eventuell positiver Effekt von EPO auf die Geweberegeneration in ischämischem Haut-Muskel-Gewebe könnte mittels Versuchsreihen mit längerer Nachbeobachtungszeit oder einem anderen Tiermodell evaluiert werden.

5.2 Hämatokrit

Bisher zeigten sich in Studien EPO-Dosen von 400-500 I.E./kg KG täglich für 10-14 Tage als effektiv bei der Verbesserung des Gewebeüberlebens. Beobachtet wurde dieser Effekt bei experimentellen Brandwunden (verbesserte Geweberegeneration (Galeano et al., 2006)) und auch bei der Hebung von

Haut-Muskel-Lappen (verringerte Nekroserate (Rezaeian et al., 2013)). Allerdings zeigten Harder et al. dass bereits die niedrige Dosis von 500 I.E./kg KG den Hämatokrit leicht an hob und die Blutrheologie veränderte (Harder et al., 2009). Awwad et al. konnten nachweisen, dass eine erhöhte Blutviskosität sich negativ auf die Durchblutung eines Gewebelappens auswirkt (Awwad et al., 1983) und Heidenreich et. al wiesen außerdem vasokonstriktorische Effekte bei der Verabreichung hoher Dosen EPO nach (Heidenreich et al., 1991). Neben einer Steigerung der Erythropoese bewirkt EPO außerdem eine Steigerung der Bildung von Blutplättchen, sowie eine gesteigerte Reaktivität der neu gebildeten Plättchen (Stohlawetz et al., 2000). In Kombination dieser Effekte kommt es durch die Gefäßverengung mit einem erhöhten peripheren Widerstand, zusammen mit einer erhöhten Blutviskosität und letztendlich mikrovaskulären Thrombosen zu einer Verschlechterung der Mikrozirkulation. Die so kompromittierte Mikrozirkulation ist folglich nicht in der Lage, das kritisch ischämische Gewebe mit Sauerstoff zu versorgen und es kommt zur Nekrosebildung. Dies deckt sich mit der Arbeit von Harder et al., in der die Versuchstiere, die durchgängig mit 5000 I.E./kg KG behandelt wurden, einen signifikant erhöhten Hämatokrit und kein verbessertes Lappenüberleben zeigten. Der negative Einfluss eines hohen Hämatokrits, besonders in den kritischen Tagen kurz vor und nach der Lappenhebung, wird ebenfalls deutlich in der Arbeit von Saray et al., die zeigen konnten, dass die Administration von EPO für drei Wochen (Saray et al., 2003) vor der Lappenhebung zu einem erhöhten Hämatokrit zum Zeitpunkt der Lappenhebung und folglich einem verminderten Lappenüberleben führte.

In der vorliegenden Studie wurde der Hämatokrit in der EPO-Niedrigdosisgruppe durch die Administration von 125 I.E./kg KG EPO alle 12 h

nicht signifikant beeinflusst und die Tiere zeigten ein deutlich verbessertes Lappenüberleben, wohingegen der Hämatokrit der EPO-Hochdosisgruppe bis Tag 10 signifikant angestiegen war und die Nekroserate der Kontrollgruppe entsprach (siehe Abb. 5 und Abb. 6). Vor allem die Zeit nach der Lappenhebung und vor der Demarkierung der Nekrose scheint entscheidend für das Gewebeüberleben zu sein. Da der Hämatokrit der Versuchsgruppen sich aber an Tag 3 noch nicht signifikant unterschied, glauben wir, dass es auf Grund der initial verabreichten hohen Dosen EPO in der Hochdosisgruppe einen ersten Hämatokrit-Peak an Tag 1-2 nach Lappenhebung gab, der die Mikrozirkulation in der kritischen Phase vor der endgültigen Demarkierung der Nekrose negativ beeinflusst hat. Dieser Peak konnte in unserem Versuchsprotokoll auf Grund der Zeitpunkte der Hämatokrit-Messungen an den Tagen 0, 3, 7 und 10 nicht erfasst werden. Die Überlegung wird aber von der Tatsache gestützt, dass beide mit EPO behandelten Gruppen einen Anstieg der Expression von eNOS zeigten, allerdings nur die EPO-Niedrigdosisgruppe einen auch zu Beginn der Untersuchung erhöhten arteriellen Blutfluss aufwies. Wir glauben, dass es in der EPO-Hochdosisgruppe zu einem kurzzeitigen, schnellen Anstieg des Hämatokrits und einer dementsprechenden Verschlechterung der Rheologie in der kritischen Phase nach dem Einsetzen der akuten anhaltenden Ischämie kam. Dies könnte die EPO-vermittelten, Hämatokrit-unabhängigen Gewebe-protectiven Effekte wieder zunichte gemacht haben.

5.3 Arterielle Perfusion

Die mit 125 I.E./kg KG EPO behandelten Tiere zeigten einen erhöhten arteriellen und nachfolgend venösen Blutfluss. Sowohl in der proximalen Lappenbasis, als auch in der kritisch perfundierten medialen Zone des Lappens

lag der Blutfluss der EPO-Niedrigdosisgruppe deutlich über dem der Kontrollgruppe und der EPO-Hochdosisgruppe (siehe Abb. 13).

Vermittelt wurde der erhöhte arterielle Blutfluss vermutlich durch eine erhöhte Ausschüttung von Stickstoffmonoxid, die zu einer arteriellen Dilatation und nachfolgend suffizienten Perfusion der ischämisch gefährdeten Gewebe führte. Immunhistologisch konnten wir in der vorliegenden Studie eine erhöhte Expression von eNOS in allen mit EPO behandelten Tieren beobachten. Die frühzeitige Stickstoffmonoxid-vermittelte Dilatation der versorgenden Arteriolen und eine nachfolgend verbesserte Kapillarperfusion decken sich mit den Ergebnissen anderer Arbeiten. Rezaeian et al. zeigten eine dilatatorische Wirkung auf Arteriolen bei der präoperativ beginnenden, wiederholten Anwendung von 500 I.E./kg KG EPO (Rezaeian et al., 2010; Rezaeian et al., 2013). Ebenso wurden bereits ein Stickstoffmonoxid-vermittelter Gewebe- protektiver Effekt von EPO auf die zerebrale Perfusion in Kaninchen (Santhanam et al., 2006) und eine Dilatation der Aorta in diabetischen Ratten (Wang et al., 2013) nachgewiesen.

Obwohl beide mit EPO behandelten Gruppen eine vermehrte Expression von eNOS aufwiesen, zeigten die Tiere der EPO-Hochdosisgruppe einen geringeren Gefäßdurchmesser mit nachfolgend geringerem Blutfluss als die Tiere der EPO-Niedrigdosisgruppe. Banerjee et al. stellten in ihrer Arbeit die Hypothese auf, dass EPO auch vasokonstriktorische Effekte besitzt, die nicht über eine direkte Einwirkung auf die Endothelzellen der Gefäßwand vermittelt werden (Banerjee et al., 2000). Vermutlich überwogen in der Hochdosisgruppe die vasokonstriktorischen Effekte, wodurch die Gewebe- protektiven Effekte von EPO nicht ausreichend zum Tragen kamen, um eine Gewebnekrose zu verhindern.

Interessant ist ebenfalls, dass die Kontrollgruppe zwischen Tag 3 und Tag 7 einen besonders steilen Anstieg des Blutflusses zeigte, der zu spät kam, um das Lappenüberleben positiv zu beeinflussen. Diese Beobachtung unterstützt die Vermutung, dass die ersten Tage nach der Hebung des Haut-Muskel-Lappens entscheidend für das Gewebeüberleben und somit auch die mögliche Anwendung von EPO sind.

5.4 Kapilläre Perfusion

In allen Gruppen war ein ähnlicher Anstieg des Kapillardurchmessers bzw. des kapillären Blutflusses im Verlauf der Beobachtungszeit zu verzeichnen (siehe Abb. 9 und Abb. 15), der Ausdruck des vermehrten Perfusionsbedarfs des kritisch ischämischen Gewebes ist. Da die Dilatation der Kapillaren in allen Gruppen ähnlich war, müssen andere Mechanismen der Grund für das erhöhte Gewebeüberleben der EPO-Niedrigdosisgruppe sein. In der vorliegenden Studie schien EPO in niedriger Dosierung vor allem über eine deutlich erhöhte funktionelle Kapillardichte (siehe Abb. 16) seine Wirkung zu entfalten und so die Nekroserate in der EPO-Niedrigdosisgruppe zu senken. Besonders in der medialen, kritisch durchbluteten Zone des Lappens lag die funktionelle Kapillardichte der EPO-Niedrigdosisgruppe weit über den Werten der anderen Versuchsgruppen, was auf die Aufrechterhaltung einer nutritiven Perfusion schließen lässt. Übereinstimmend hiermit konnten Shen et al. nachweisen, dass die systemische Anwendung von EPO eine Rarefizierung von perfundierten Kapillaren in der Retina diabetischer Ratten verhindern konnte und zu einer signifikant höheren funktionellen Kapillardichte führte (Shen et al., 2014). Die Austauschfläche für den Übertritt von Sauerstoff in das kritisch versorgte Gewebe wurde außerdem durch einen erhöhten Tortuositätsindex der EPO-Niedrigdosisgruppe vergrößert (siehe Abb. 17). Die Anwendung von 125 I.E./kg

KG war so in der Lage eine suffiziente Versorgung des kritisch perfundierten Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen zu gewährleisten und das Haut-Muskel-Gewebe vor Nekrose zu schützen.

Da die funktionelle Kapillardichte in der EPO-Niedrigdosisgruppe sofort nach Lappenhebung deutlich erhöht war, führte EPO nicht über die Neubildung von Kapillaren zu einem erhöhten Gewebeüberleben. Vielmehr schienen existierende Kapillaren, die zuvor noch nicht durchblutet waren, durch das verabreichte EPO rekrutiert zu werden und so bereits initial die funktionelle Kapillardichte anzuheben. Diese Beobachtung ist ein weiterer Beweis dafür, dass die ersten Tage nach der Lappenhebung und vor der Demarkation der Nekrose das entscheidende Zeitfenster sind, in dem eine wirksame Behandlung mit EPO vorgenommen werden kann.

5.5 Neoangiogenese

Bei der Beobachtung der Übergangszone zwischen dem vitalen und dem nekrotischen Anteil des Lappens konnten im Verlauf der Versuchszeit nur in den mit EPO behandelten Gruppen Gefäßneubildungen beobachtet werden (siehe Abb. 18). Als Anzeichen der Gefäßneubildung wurden hierbei beispielsweise die typischen Gefäßknospen („buds“) und Gefäßaussprossungen („sprouts“) gewertet (Senger & Davis, 2011) und die senkrecht zu den existierenden Kapillaren aussprossenden neuen Gefäße quantifiziert. Beide mit EPO behandelten Gruppen zeigten hierbei einen Anstieg der Neoangiogenese im Vergleich zur Kontrollgruppe, der nur in der EPO-Niedrigdosisgruppe an Tag 7 und Tag 10 signifikant wurde. Im Einklang damit zeigten in der immunhistologischen Färbung auf VEGF die mit EPO behandelten Tiere ein erhöhtes Vorkommen des Proteins im Vergleich zur Kontrollgruppe. VEGF ist ein Signalpeptid, das von Zellen produziert wird, um

die Angiogenese zu stimulieren. Es ist hierbei Teil einer Signalkaskade, die die Sauerstoff-Balance wiederherstellen soll, wenn der Blutfluss im Gewebe reduziert ist. Die VEGF-Produktion wird vor allem durch Hypoxie ausgelöst, kann aber auch durch verschiedene andere Faktoren stimuliert werden (Senger & Davis, 2011). Da die VEGF-Expression in der vorliegenden Studie bereits in den Gewebeproben von Tag 0 und somit vor der Induktion der kritischen Ischämie erhöht war (siehe Abb. 21D), lässt sich vermuten, dass auch EPO die Ausschüttung von VEGF stimuliert. Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Arbeiten überein. So konnten beispielsweise Nakano et al. zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen dem EPO-Rezeptor-System und der Expression von VEGF besteht (Nakano et al., 2007).

Die VEGF-vermittelte Gefäßneubildung konnte das Gewebeüberleben nicht mehr beeinflussen, da die Formation neuer Gefäße erst 5-7 Tage nach Lappenhebung und somit nach der Demarkation der Nekrose beobachtet wurde. Dennoch könnte eine EPO-induzierte Neoangiogenese eine wichtige Rolle in der nachfolgenden Regeneration des ischämischen Haut-Muskel-Gewebes spielen. Die neugebildeten Gefäße sind hierbei notwendig, um beispielsweise Granulationsgewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen (Buemi et al., 2004; Haroon et al., 2003). Auch Rezaeian et al. konnten unter der Anwendung von EPO bei kritisch perfundiertem Haut-Muskel-Gewebe eine verbesserte Geweberegeneration beobachten, die allerdings auf das Gewebeüberleben keinen Einfluss hatte (Rezaeian et al., 2013). Dies deckt sich auch mit Arbeiten über andere Gewebe, in denen EPO beispielsweise einen positiven Effekt auf die Regeneration von myokardialem Gewebe zeigte (Gabel et al., 2009). EPO ist daher ein möglicher Wirkstoff für die Beschleunigung von Geweberegeneration.

5.6 Inflammation

Auf der gesamten Fläche des Haut-Muskel-Lappens der verwendeten Versuchstiere konnte eine postinterventionelle, durch die Lappenhebung und Kammermontierung induzierte Entzündungsreaktion beobachtet werden, die im Lauf des Beobachtungszeitraumes tendenziell rückläufig war. In der vorliegenden Studie konnten keine größeren Unterschiede zwischen den mit EPO behandelten Gruppen und der Kontrollgruppe gezeigt werden.

Im Gegensatz hierzu konnten in anderen Studien bereits signifikante antiinflammatorische Effekte von EPO nachgewiesen werden (Cravedi et al., 2014; Villa et al., 2003). Auch in Arbeiten über ischämisches Haut-Muskel-Gewebe konnten antiinflammatorische Effekte beobachtet werden (Harder et al., 2009; Rezaeian et al., 2008; Rezaeian et al., 2013), die direkt oder indirekt durch EPO vermittelt werden und so ebenfalls das Gewebeüberleben verbessern.

Eine mögliche Erklärung für das Fehlen dieser Effekte in der vorliegenden Studie ist, dass die unbehandelten Lappen der Kontrolltiere mehr Gewebeödem entwickelten. Die Bildqualität beim Mikroskopieren war durch ein solches Ödem möglicherweise beeinträchtigt, sodass weniger Leukozyten identifiziert und gezählt werden konnten und die tatsächliche Anzahl der Leukozyten in der Kontrollgruppe eventuell höher lag als von uns nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz hierzu entwickelten die mit EPO behandelten Tiere in ihren Lappen tendenziell weniger Gewebeödem und ermöglichten schärfere und besser auswertbare Mikroskopie-Aufnahmen.

5.7 Apoptose

In der vorliegenden Studie zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren der Kontrollgruppe und den mit EPO behandelten Tieren bezüglich des Vorkommens von apoptotischen Zellen (siehe Abb. 19).

Im Gegensatz zu unseren Beobachtungen an kritisch durchblutetem Haut-Muskel-Gewebe konnten andere Arbeiten einen EPO-bedingten antiapoptotischen Effekt, wie z.B. eine Verringerung der Apoptosen in neuronalem Gewebe (Marti, 2004; Mofidi et al., 2011; Yamada et al., 2011), in der Retina des Auges (Mowat et al., 2012), am Herzen (Vilarinho et al., 2013) und in der Niere (Gobe et al., 2014; Pallet et al., 2010) nachweisen. Dieser protektive Effekt gegen apoptotischen Zelltod konnte in der vorliegenden Studie nicht reproduziert werden. Er könnte ein weiterer Mechanismus der Gewebeprotektion von EPO sein, der nicht über die Erhaltung des Blutflusses vermittelt wird.

Übereinstimmend mit den antiapoptotischen Effekten in anderen Geweben, konnte auch in Vorarbeiten mit kritisch perfundiertem Haut-Muskel-Gewebe ein antiapoptotischer Effekt von EPO nachgewiesen werden (Harder et al., 2009). Harder et al. beobachteten die stärkste antiapoptotische Wirkung bei einer Prä- und Postkonditionierung mit 500 I.E./kg KG, die Verabreichung von 5000 I.E./kg KG war deutlich weniger effektiv. Möglicherweise befanden sich die von uns verwendeten Dosen also entweder oberhalb (EPO-high) oder unterhalb (EPO-low) der Dosierung mit der stärksten antiapoptotischen Wirkung und kamen daher nicht zu Tragen.

6. Schlussfolgerung

Die Prä- und Postkonditionierung mit konstant niedrigen Dosierungen EPO ist in der Lage die Nekroserate von ischämischem Haut- und Muskel-Gewebe signifikant zu verringern, obwohl wir in der vorliegenden Studie keinen antiinflammatorischen oder antiapoptotischen Effekt nachweisen konnten. Die verminderte Nekroserate ist als Folge einer verbesserten arteriellen Perfusion und einer nachfolgenden Aufrechterhaltung der nutritiven Kapillarperfusion zu sehen. Sowohl durch den erhöhten Blutfluss, als auch über die vergrößerte Austauschfläche konnte das ischämisch gefährdete Gewebe besser mit Sauerstoff versorgt und so das Gewebeüberleben verbessert werden.

Die initiale Gabe von hohen EPO-Dosierungen zeigte keine Gewebeprotektion. Die hohe Nekroserate der EPO-Hochdosisgruppe ist am ehesten als Folge einer post-ischämischen, Hämatokrit-bedingten Blutverdickung anzusehen. Trotz einer raschen Dosisreduktion auf Hämatokrit-irrelevante Dosierungen führten die negativen Effekte der verschlechterten Blutrheologie dazu, dass es im Vergleich zur Kontrollgruppe zu keiner Verbesserung des Gewebeüberlebens kam.

Prä- und Postkonditionierung mit Hämatokrit-irrelevanten EPO-Dosierungen stellen somit einen viel versprechenden therapeutischen Ansatz zur Verringerung ischämisch bedingter Komplikationen in der klinischen Lappenchirurgie dar.

Eine weitere interessante Option wäre die Verwendung von Erythropoetin mit modifizierter Molekülstruktur, welches keine Hämatokrit-steigernde Wirkung mehr besitzt. Hierfür kommen verschiedene Moleküle in Frage. Zum einen Asialo-EPO, dessen hämatopoetische Wirkungen bei einer Plasmahalbwertszeit von 1,4 min und einem Abfall unter die Nachweisgrenze

innerhalb von 1-2 Stunden (Halbwertszeit von normalem EPO ca. 5-6 h) vernachlässigbar ist (Erbayraktar et al., 2003). Sowohl neuroprotektive, kardioprotektive, als auch renoprotektive Effekte konnten bereits nachgewiesen werden (Mennini et al., 2006; Okada et al., 2007; Takeyama et al., 2012).

Zum anderen das sogenannte C-EPO, eine carbamylierte Form des Erythropoetins, das nicht an den klassischen, homodimeren EPO-Rezeptor bindet, sondern seine Effekte vermutlich über einen Zytokin-Rezeptor entfaltet (Leist et al., 2004). Auch diesem Molekül konnten bereits neuro- und renoprotektive Effekte nachgewiesen werden, die es ebenfalls zu einem attraktiven Kandidaten für die Gewebepräkonditionierung von Haut- und Muskelgewebe machen (Mennini et al., 2006; Togel et al., 2016).

Abschließend ist zu sagen, dass Erythropoetin besonders in der plastischen Lappenchirurgie hohes Anwendungspotenzial jenseits der Steigerung der Erythrozytenmasse besitzt, welches klinisch genutzt werden sollte.

7. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|------------------------------|
| ANOVA | Analysis of Variance |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BL | Baseline |
| bzw. | beziehungsweise |
| C | Celsius |
| ca. | circa |
| C-EPO | carbamyliertes EPO |
| cm | Zentimeter |
| cm ² | Quadratzenimeter |
| d | Tag |
| Da | Dalton |
| DCIA | Deep Circumflex Iliac Artery |
| EPO | Erythropoetin |
| EPO-R | Erythropoetinrezeptor |
| etc. | et cetera |
| FCD | Funktionelle Kapillardichte |
| FITC | Fluoreszein-Isothiozyanat |
| ggf. | gegebenenfalls |
| h | Stunde |
| I.E. | internationale Einheiten |
| i.p. | intraperitoneal |
| i.v. | intravenös |
| KG | Körpergewicht |
| LTA | Lateral Thoracic Artery |
| mg | Milligramm |

| | |
|-----------------|-------------------------------|
| mm | Millimeter |
| mm ² | Quadratmillimeter |
| μl | Mikroliter |
| μm | Mikrometer |
| n | Anzahl |
| NA | Numerische Apertur |
| NaCl | Natriumchlorid |
| nm | Nanometer |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| p | Irrtumswahrscheinlichkeit |
| ROI | Region of Interest |
| sec | Sekunde |
| SEM | Standard Error of the Mean |
| sog. | sogenannt |
| s.c. | subkutan |
| TBS | Tris-buffered Saline Solution |
| TNFα | Tumornekrosefaktor α |
| VEGF | Vasoendothelial Growthfactor |
| vs. | versus |
| z.B. | zum Beispiel |

8. Literaturverzeichnis

Ateshkadi, A., Johnson, C. A., Oxtan, L. L., Hammond, T. G., Bohenek, W. S., & Zimmerman, S. W. (1993). Pharmacokinetics of intraperitoneal, intravenous, and subcutaneous recombinant human erythropoietin in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis*, 21(6), 635-642.

Awwad, A. M., White, R. J., Lowe, G. D., & Forbes, C. D. (1983). The effect of blood viscosity on blood flow in the experimental saphenous flap model. *Br J Plast Surg*, 36(3), 383-386.

Banerjee, D., Rodriguez, M., Nag, M., & Adamson, J. W. (2000). Exposure of endothelial cells to recombinant human erythropoietin induces nitric oxide synthase activity. *Kidney Int*, 57(5), 1895-1904. doi:10.1046/j.1523-1755.2000.00039.x

Barthe Garcia, P., Suarez Nieto, C., & Rojo Ortega, J. M. (1991). Morphological changes in the vascularisation of delayed flaps in rabbits. *Br J Plast Surg*, 44(4), 285-290.

Beru, N., McDonald, J., Lacombe, C., & Goldwasser, E. (1986). Expression of the erythropoietin gene. *Mol Cell Biol*, 6(7), 2571-2575.

Buemi, M., Galeano, M., Sturiale, A., Ientile, R., Crisafulli, C., Parisi, A., Catania, M., Calapai, G., Impalà, P., Aloisi, C., Squadrito, F., Altavilla, D., Bitto, A., Tuccari, G., Frisina, N. (2004). Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and healing of ischemic skin wounds. *Shock*, 22(2), 169-173.

Burger, D. E., Xiang, F. L., Hammoud, L., Jones, D. L., & Feng, Q. (2009). Erythropoietin protects the heart from ventricular arrhythmia during ischemia and reperfusion via neuronal nitric-oxide synthase. *J Pharmacol Exp Ther*, 329(3), 900-907. doi:10.1124/jpet.109.150896

Calvillo, L., Latini, R., Kajstura, J., Leri, A., Anversa, P., Ghezzi, P., Salio, M., Cerami, A., Brines, M. (2003). Recombinant human erythropoietin protects the

myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(8), 4802-4806.
doi:10.1073/pnas.0630444100

Carroll, C. M., Carroll, S. M., Overgoor, M. L., Tobin, G., & Barker, J. H. (1997). Acute ischemic preconditioning of skeletal muscle prior to flap elevation augments muscle-flap survival. *Plast Reconstr Surg*, 100(1), 58-65.

Champaneria, M. C., Workman, A. D., & Gupta, S. C. (2014). Sushruta: father of plastic surgery. *Ann Plast Surg*, 73(1), 2-7.
doi:10.1097/SAP.0b013e31827ae9f5

Cinpolat, A., Bektas, G., Coskunfirat, N., Rizvanovic, Z., & Coskunfirat, O. K. (2014). Comparing various surgical delay methods with ischemic preconditioning in the rat TRAM flap model. *J Reconstr Microsurg*, 30(5), 335-342. doi:10.1055/s-0033-1363326

Contedini, F., Negosanti, L., Fabbri, E., Pinto, V., Tavaniello, B., Sgarzani, R., & Cipriani, R. (2012). Cross-leg as salvage procedure after free flaps transfer failure: a case report. *Case Rep Orthop*, 2012, 205029.
doi:10.1155/2012/205029

Cravedi, P., Manrique, J., Hanlon, K. E., Reid-Adam, J., Brody, J., Prathuangsuk, P., Mehrotra, A., Heeger, P. S. (2014). Immunosuppressive effects of erythropoietin on human alloreactive T cells. *J Am Soc Nephrol*, 25(9), 2003-2015. doi:10.1681/asn.2013090945

Dogan, F., & Ozyazgan, I. (2015). Flap Preconditioning by Electrical Stimulation as an Alternative to Surgical Delay: Experimental Study. *Ann Plast Surg*, 75(5), 560-564. doi:10.1097/sap.000000000000162

Erbayraktar, S., Grasso, G., Sfacteria, A., Xie, Q. W., Coleman, T., Kreilgaard, M., Torup, L., Sager, T., Erbayraktar, Z., Gokmen, N., Yilmaz, O., Ghezzi, P., Villa, P., Fratelli, M., Casagrande, S., Leist, M., Helboe, L., Gerwein, J., Christensen, S., Geist, M.A., Pedersen, L.Ø., Cerami-Hand, C., Wuerth, J.P., Cerami, A., Brines, M. (2003). Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic

cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(11), 6741-6746. doi:10.1073/pnas.1031753100

Fried, W., Kilbridge, T., Krantz, S., McDonald, T. P., & Lange, R. D. (1969). Studies on extrarenal erythropoietin. *J Lab Clin Med*, 73(2), 244-248.

Gabel, R., Klopsch, C., Furlani, D., Yerebakan, C., Li, W., Ugurlucan, M., Ma, N., Steinhoff, G. (2009). Single high-dose intramyocardial administration of erythropoietin promotes early intracardiac proliferation, proves safety and restores cardiac performance after myocardial infarction in rats. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 9(1), 20-25; discussion 25. doi:10.1510/icvts.2008.191916

Galeano, M., Altavilla, D., Bitto, A., Minutoli, L., Calo, M., Lo Cascio, P., Polito, F., Giugliano, G., Squadrito, G., Mioni, C., Giuliani, D., Venuti, F.S., Squadrito, F. (2006). Recombinant human erythropoietin improves angiogenesis and wound healing in experimental burn wounds. *Crit Care Med*, 34(4), 1139-1146. doi:10.1097/01.ccm.0000206468.18653.ec

Gobe, G. C., Bennett, N. C., West, M., Colditz, P., Brown, L., Vesey, D. A., & Johnson, D. W. (2014). Increased progression to kidney fibrosis after erythropoietin is used as a treatment for acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 306(6), F681-692. doi:10.1152/ajprenal.00241.2013

Greig, A., Gohritz, A., Geishauser, M., & Muhlbauer, W. (2015). Heinrich von Pfalzpaint, Pioneer of Arm Flap Nasal Reconstruction in 1460, More Than a Century Before Tagliacozzi. *J Craniofac Surg*, 26(4), 1165-1168. doi:10.1097/scs.0000000000001625

Hamilton, F. H. (1854). Elkoplasty, or, old ulcers treated by anaplasty. *New York Journal of Medicine*, 5(2), 165-173.

Harder, Y., Amon, M., Erni, D., & Menger, M. D. (2004). Evolution of ischemic tissue injury in a random pattern flap: a new mouse model using intravital microscopy. *J Surg Res*, 121(2), 197-205. doi:10.1016/j.jss.2004.03.026

Harder, Y., Amon, M., Georgi, M., Banic, A., Erni, D., & Menger, M. D. (2005). Evolution of a "falx lunatica" in demarcation of critically ischemic myocutaneous tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288(3), H1224-1232.
doi:10.1152/ajpheart.00640.2004

Harder, Y., Amon, M., Schramm, R., Contaldo, C., Metzkwow, E., Matzen, A., Rücker, M., Vollmar, B., Menger, M. D. (2009). Erythropoietin reduces necrosis in critically ischemic myocutaneous tissue by protecting nutritive perfusion in a dose-dependent manner. *Surgery*, 145(4), 372-383.
doi:10.1016/j.surg.2008.12.001

Harder, Y., Amon, M., Schramm, R., Georgi, M., Banic, A., Erni, D., & Menger, M. D. (2005). Heat shock preconditioning reduces ischemic tissue necrosis by heat shock protein (HSP)-32-mediated improvement of the microcirculation rather than induction of ischemic tolerance. *Ann Surg*, 242(6), 869-878, discussion 878-869.

Harder, Y., Contaldo, C., Klenk, J., Banic, A., Jakob, S. M., & Erni, D. (2005). Preconditioning with monophosphoryl lipid A improves survival of critically ischemic tissue. *Anesth Analg*, 100(6), 1786-1792.
doi:10.1213/01.ane.0000152007.14854.6b

Harder, Y., Schmauss, D., Wettstein, R., Egana, J. T., Weiss, F., Weinzierl, A., Schuldt, A., Machens, H.G., Menger, M.D., Rezaeian, F. (2014). Ischemic tissue injury in the dorsal skinfold chamber of the mouse: a skin flap model to investigate acute persistent ischemia. *J Vis Exp*(93), e51900.
doi:10.3791/51900

Haroon, Z. A., Amin, K., Jiang, X., & Arcasoy, M. O. (2003). A novel role for erythropoietin during fibrin-induced wound-healing response. *Am J Pathol*, 163(3), 993-1000. doi:10.1016/s0002-9440(10)63459-1

Hasselblatt, M., Ehrenreich, H., & Siren, A. L. (2006). The brain erythropoietin system and its potential for therapeutic exploitation in brain disease. *J Neurosurg Anesthesiol*, 18(2), 132-138.

Hausenloy, D. J., Barrabes, J. A., Botker, H. E., Davidson, S. M., Di Lisa, F., Downey, J., Engstrom, T., Ferdinandy, P., Carbrera-Fuentes, H.A., Heusch, G., Ibanez, B., Iliodromitis, E.K., Inserte, J., Jennings, R., Kalia, N., Kharbanda, R., Lecour, S., Marber, M., Miura, T., Ovize, M., Perez-Pinzon, M.A29., Piper, H.M., Przyklenk, K., Schmidt, M.R., Redington, A., Ruiz-Meana, M., Vilahur, G., Vinten-Johansen, J., Yellon, D.M., Garcia-Dorado, D. (2016). Ischaemic conditioning and targeting reperfusion injury: a 30 year voyage of discovery. *Basic Res Cardiol*, 111(6), 70. doi:10.1007/s00395-016-0588-8

Heidenreich, S., Rahn, K. H., & Zidek, W. (1991). Direct vasopressor effect of recombinant human erythropoietin on renal resistance vessels. *Kidney Int*, 39(2), 259-265.

Janis, J. E., Kwon, R. K., & Attinger, C. E. (2011). The new reconstructive ladder: modifications to the traditional model. *Plast Reconstr Surg*, 127 Suppl 1, 205s-212s. doi:10.1097/PRS.0b013e318201271c

Johnson, W. J., McCarthy, J. T., Yanagihara, T., Osmundson, P. J., Ilstrup, D. M., Jenson, B. M., & Bowie, E. J. (1990). Effects of recombinant human erythropoietin on cerebral and cutaneous blood flow and on blood coagulability. *Kidney Int*, 38(5), 919-924.

Klyscz, T., Junger, M., Jung, F., & Zeintl, H. (1997). [Cap image--a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy]. *Biomed Tech (Berl)*, 42(6), 168-175.

Koury, S. T., Bondurant, M. C., Koury, M. J., & Semenza, G. L. (1991). Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization. *Blood*, 77(11), 2497-2503.

Koury, S. T., Koury, M. J., & Bondurant, M. C. (1988). Morphological changes in erythroblasts during erythropoietin-induced terminal differentiation in vitro. *Exp Hematol*, 16(9), 758-763.

Kowalczyk, M., Banach, M., Mikhailidis, D. P., & Rysz, J. (2011). Erythropoietin update 2011. *Med Sci Monit*, 17(11), Ra240-247.

- Krantz, S. B. (1991). Erythropoietin. *Blood*, 77(3), 419-434.
- Leist, M., Ghezzi, P., Grasso, G., Bianchi, R., Villa, P., Fratelli, M., Savino, C., Bianchi, M., Nielsen, J., Gerwien, J., Kallunki, P., Larsen, A.K., Helboe, L., Christensen, S., Pedersen, L.O., Nielsen, M., Torup, L., Sager, T., Sfacteria, A., Erbayraktar, S., Erbayraktar, Z., Gokmen, N., Yilmaz, O., Cerami-Hand, C., Xie, Q.W., Coleman, T., Cerami, A., Brines, M. (2004). Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science*, 305(5681), 239-242. doi:10.1126/science.1098313
- Long, C. D., Granick, M. S., & Solomon, M. P. (1993). The cross-leg flap revisited. *Ann Plast Surg*, 30(6), 560-563.
- Marsden, P. A., Schappert, K. T., Chen, H. S., Flowers, M., Sundell, C. L., Wilcox, J. N., Lamas, S., Michel, T. (1992). Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett*, 307(3), 287-293.
- Marti, H. H. (2004). Erythropoietin and the hypoxic brain. *J Exp Biol*, 207(Pt 18), 3233-3242. doi:10.1242/jeb.01049
- Masuda, S., Okano, M., Yamagishi, K., Nagao, M., Ueda, M., & Sasaki, R. (1994). A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem*, 269(30), 19488-19493.
- Mennini, T., De Paola, M., Bigini, P., Mastrotto, C., Fumagalli, E., Barbera, S., Mengozzi, M., Viviani, B., Corsini, E., Marinovich, M., Torup, L., Van Beek, J., Leist, M., Brines, M., Cerami, A., Ghezzi, P. (2006). Nonhematopoietic erythropoietin derivatives prevent motoneuron degeneration in vitro and in vivo. *Mol Med*, 12(7-8), 153-160. doi:10.2119/2006-00045.Mennini
- Mofidi, A., Bader, A., & Pavlica, S. (2011). The use of erythropoietin and its derivatives to treat spinal cord injury. *Mini Rev Med Chem*, 11(9), 763-770.

Monge Naldi, A., Gassmann, M., & Bodmer, D. (2009). Erythropoietin but not VEGF has a protective effect on auditory hair cells in the inner ear. *Cell Mol Life Sci*, 66(22), 3595-3599. doi:10.1007/s00018-009-0144-x

Moran, S. L., & Serletti, J. M. (2001). Outcome comparison between free and pedicled TRAM flap breast reconstruction in the obese patient. *Plast Reconstr Surg*, 108(7), 1954-1960; discussion 1961-1952.

Mowat, F. M., Gonzalez, F., Luhmann, U. F., Lange, C. A., Duran, Y., Smith, A. J., Maxwell, P.H., Ali, R.R., Bainbridge, J. W. (2012). Endogenous erythropoietin protects neuroretinal function in ischemic retinopathy. *Am J Pathol*, 180(4), 1726-1739. doi:10.1016/j.ajpath.2011.12.033

Mulcahy, L. (2001). The erythropoietin receptor. *Semin Oncol*, 28(2 Suppl 8), 19-23.

Murry, C. E., Jennings, R. B., & Reimer, K. A. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74(5), 1124-1136.

Murry, C. E., Richard, V. J., Reimer, K. A., & Jennings, R. B. (1990). Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during a sustained ischemic episode. *Circ Res*, 66(4), 913-931.

Nakamura, S., Sho, M., Koyama, F., Ueda, T., Nishigori, N., Inoue, T., Nakamoto, T., Fujii, H., Yoshikawa, S., Inatsugi, N., Nakajima, Y. (2015). Erythropoietin attenuates intestinal inflammation and promotes tissue regeneration. *Scand J Gastroenterol*, 50(9), 1094-1102. doi:10.3109/00365521.2015.1020861

Nakano, M., Satoh, K., Fukumoto, Y., Ito, Y., Kagaya, Y., Ishii, N., Sugamura, K., Shimokawa, H. (2007). Important role of erythropoietin receptor to promote VEGF expression and angiogenesis in peripheral ischemia in mice. *Circ Res*, 100(5), 662-669. doi:10.1161/01.RES.0000260179.43672.fe

- Okada, T., Sawada, T., & Kubota, K. (2007). Asialoerythropoietin has strong renoprotective effects against ischemia-reperfusion injury in a murine model. *Transplantation*, *84*(4), 504-510. doi:10.1097/01.tp.0000277672.02783.33
- Pallet, N., Bouvier, N., Legendre, C., Beaune, P., Thervet, E., Choukroun, G., & Martinez, F. (2010). Antiapoptotic properties of recombinant human erythropoietin protects against tubular cyclosporine toxicity. *Pharmacol Res*, *61*(1), 71-75. doi:10.1016/j.phrs.2009.08.010
- Patel, N. S., Sharples, E. J., Cuzzocrea, S., Chatterjee, P. K., Britti, D., Yaqoob, M. M., & Thiernemann, C. (2004). Pretreatment with EPO reduces the injury and dysfunction caused by ischemia/reperfusion in the mouse kidney in vivo. *Kidney Int*, *66*(3), 983-989. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00847.x
- R-Core-Team. (2014). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Retrieved from <https://www.R-project.org/>.
- Reinisch, J. F. (1974). The pathophysiology of skin flap circulation. The delay phenomenon. *Plast Reconstr Surg*, *54*(5), 585-598.
- Reisler, T., Buziashvili, D., Liu, F. C., & Datiashvili, R. O. (2016). Revisiting the Fasciocutaneous Perforator Cross-Leg Flap. *Eplasty*, *16*, ic16.
- Rezaeian, F., Wettstein, R., Amon, M., Scheuer, C., Schramm, R., Menger, M. D., Pittet, B., Harder, Y. (2008). Erythropoietin protects critically perfused flap tissue. *Ann Surg*, *248*(6), 919-929. doi:10.1097/SLA.0b013e31818f678e
- Rezaeian, F., Wettstein, R., Egger, J. F., Sandmann, F., Rucker, M., Tobalem, M., Vollmar, B., Menger, M.D., Harder, Y. (2010). Erythropoietin-induced upregulation of endothelial nitric oxide synthase but not vascular endothelial growth factor prevents musculocutaneous tissue from ischemic damage. *Lab Invest*, *90*(1), 40-51. doi:10.1038/labinvest.2009.117
- Rezaeian, F., Wettstein, R., Scheuer, C., Baumker, K., Bachle, A., Vollmar, B., Menger, M.D., Harder, Y. (2012). Ghrelin protects musculocutaneous tissue

from ischemic necrosis by improving microvascular perfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 302(3), H603-610. doi:10.1152/ajpheart.00390.2010

Rezaeian, F., Wettstein, R., Scheuer, C., Schenck, T. L., Egana, J. T., Machens, H. G., Mender, M.D., Harder, Y. (2013). Long-term preconditioning with erythropoietin reduces ischemia-induced skin necrosis. *Microcirculation*, 20(8), 693-702. doi:10.1111/micc.12059

Ribatti, D., Presta, M., Vacca, A., Ria, R., Giuliani, R., Dell'Era, P., Nico, B., Roncali, L., Dammacco, F. (1999). Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood*, 93(8), 2627-2636.

Santhanam, A. V., Smith, L. A., Nath, K. A., & Katusic, Z. S. (2006). In vivo stimulatory effect of erythropoietin on endothelial nitric oxide synthase in cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291(2), H781-786. doi:10.1152/ajpheart.00045.2006

Saray, A., Ozakpinar, R., Koc, C., Serel, S., Sen, Z., & Can, Z. (2003). Effect of chronic and short-term erythropoietin treatment on random flap survival in rats: an experimental study. *Laryngoscope*, 113(1), 85-89. doi:10.1097/00005537-200301000-00016

Senger, D. R., & Davis, G. E. (2011). Angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(8), a005090. doi:10.1101/cshperspect.a005090

Sepodes, B., Maio, R., Pinto, R., Sharples, E., Oliveira, P., McDonald, M., Yaqoob, M., Thiemermann, C., Mota-Filipe, H. (2006). Recombinant human erythropoietin protects the liver from hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transpl Int*, 19(11), 919-926. doi:10.1111/j.1432-2277.2006.00366.x

Shen, W., Chung, S. H., Irhimeh, M. R., Li, S., Lee, S. R., & Gillies, M. C. (2014). Systemic administration of erythropoietin inhibits retinopathy in RCS rats. *PLoS One*, 9(8), e104759. doi:10.1371/journal.pone.0104759

Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., & Keshet, E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 359(6398), 843-845. doi:10.1038/359843a0

Singmann, H., Bolker, B., Westfall, J., & Aust, F. (2016). afex: Analysis of Factorial Experiments. R package version 0.16-1.

Sosin, M., & Rodriguez, E. D. (2016). The Face Transplantation Update: 2016. *Plast Reconstr Surg*, 137(6), 1841-1850. doi:10.1097/prs.0000000000002149

Steel, C. D., Stephens, A. L., Hahto, S. M., Singletary, S. J., & Ciavarra, R. P. (2008). Comparison of the lateral tail vein and the retro-orbital venous sinus as routes of intravenous drug delivery in a transgenic mouse model. *Lab Anim (NY)*, 37(1), 26-32. doi:10.1038/labani0108-26

Stohlawetz, P. J., Dzirlo, L., Hergovich, N., Lackner, E., Mensik, C., Eichler, H. G., Kabrna, E., Geissler, K., Jilma, B. (2000). Effects of erythropoietin on platelet reactivity and thrombopoiesis in humans. *Blood*, 95(9), 2983-2989.

Takeyama, T., Takemura, G., Kanamori, H., Kawaguchi, T., Ogino, A., Watanabe, T., Morishita, K., Tsujimoto, A., Goto, K., Maruyama, R., Ushikoshi, H., Kawasaki, M., Yamada, K., Nikami, H., Fujiwara, T., Fujiwara, H., Minatoguchi, S. (2012). Asialoerythropoietin, a nonerythropoietic derivative of erythropoietin, displays broad anti-heart failure activity. *Circ Heart Fail*, 5(2), 274-285. doi:10.1161/circheartfailure.111.965061

Tamai, S. (2009). History of microsurgery. *Plast Reconstr Surg*, 124(6 Suppl), e282-294. doi:10.1097/PRS.0b013e3181bf825e

Tanaka, N., Yamaguchi, A., Ogi, K., & Kohama, G. (2003). Sternocleidomastoid myocutaneous flap for intraoral reconstruction after resection of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg*, 61(10), 1179-1183.

Tobalem, M., Wettstein, R., Pittet-Cuenod, B., Vigato, E., Machens, H. G., Lohmeyer, J. A., Rezaeian, F., Harder, Y. (2013). Local shockwave-induced

capillary recruitment improves survival of musculocutaneous flaps. *J Surg Res*, 184(2), 1196-1204. doi:10.1016/j.jss.2013.03.040

Togel, F. E., Ahlstrom, J. D., Yang, Y., Hu, Z., Zhang, P., & Westenfelder, C. (2016). Carbamylated Erythropoietin Outperforms Erythropoietin in the Treatment of AKI-on-CKD and Other AKI Models. *J Am Soc Nephrol*, 27(11), 3394-3404. doi:10.1681/asn.2015091059

Vilarinho, K. A., de Oliveira, P. P., Saad, M. J., Eghtesady, P., Filho, L. M., Vieira, R. W., & Petrucci, O. (2013). Erythropoietin protects the systolic function of neonatal hearts against ischaemia/reperfusion injury. *Eur J Cardiothorac Surg*, 43(1), 156-162. doi:10.1093/ejcts/ezs254

Villa, P., Bigini, P., Mennini, T., Agnello, D., Laragione, T., Cagnotto, A., Viviani, B., Marinovich, M., Cerami, A., Coleman, T.R., Brines, M., Ghezzi, P. (2003). Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J Exp Med*, 198(6), 971-975. doi:10.1084/jem.20021067

Wang, J., Toba, H., Morita, Y., Nakashima, K., Noda, K., Tian, W., Kobara, M., Nakata, T. (2013). Endothelial dysfunction, macrophage infiltration and NADPH oxidase-dependent superoxide production were attenuated by erythropoietin in streptozotocin-induced diabetic rat aorta. *Pharmacology*, 91(1-2), 48-58. doi:10.1159/000343963

Yamada, M., Burke, C., Colditz, P., Johnson, D. W., & Gobe, G. C. (2011). Erythropoietin protects against apoptosis and increases expression of non-neuronal cell markers in the hypoxia-injured developing brain. *J Pathol*, 224(1), 101-109. doi:10.1002/path.2862

Yamashita, N., Hoshida, S., Taniguchi, N., Kuzuya, T., & Hori, M. (1998). Whole-body hyperthermia provides biphasic cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in the rat. *Circulation*, 98(14), 1414-1421.

Yardeni, T., Eckhaus, M., Morris, H. D., Huizing, M., & Hoogstraten-Miller, S. (2011). Retro-orbital injections in mice. *Lab Anim (NY)*, 40(5), 155-160.
doi:10.1038/labani0511-155

Yunoki, M., Nishio, S., Ukita, N., Anzivino, M. J., & Lee, K. S. (2002). Characteristics of hypothermic preconditioning influencing the induction of delayed ischemic tolerance. *J Neurosurg*, 97(3), 650-657.
doi:10.3171/jns.2002.97.3.0650

9. Danksagung

Abschließend möchte ich mich herzlich bei alldenjenigen bedanken, ohne deren Hilfe und Unterstützung ich diese Doktorarbeit nicht hätte anfertigen können.

Mein Dank gilt insbesondere meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Yves Harder, Viceprimario für Chirurgie am Ospedale Regionale di Lugano, der mir dieses spannende Thema zur Verfügung stellte. Auch nach seinem Wechsel vom Klinikum Rechts der Isar nach Lugano stand er mir trotz räumlicher Entfernung hilfsbereit, verständnisvoll und voller zielgerichteter Anregungen zur Seite und half mir, nicht den Überblick zu verlieren.

Ein ebenso großer Dank gilt meinem direkten Betreuer PD Dr. med. Daniel Schmauss, der stets an mich geglaubt hat und mich während meiner Arbeit vorbildlich angeleitet und unterstützt hat. Seine Motivation und seine fachlichen Kenntnisse haben maßgeblich zur Anfertigung dieser Arbeit beigetragen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern und Angestellten des Zentrums für präklinische Forschung und der Klinik und Poliklinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie des Klinikums Rechts der Isar für deren freundliche und tatkräftige Unterstützung.

Ebenso gilt mein Dank meinen Mitdoktoranden Kariem Agua, Anna Schuldt und Fabian Weiß, die mir das Gefühl gaben nicht allein zu sein und mich mit offenen Armen in ihrem Team begrüßt haben.

Auch meiner Familie und meinen Freunden gilt ein Dank für ihre Unterstützung und Motivation, ebenso wie für ihre Rücksicht und ihr Verständnis.