

Abteilung für Plastische und Wiederherstellungschirurgie des Klinikums rechts der Isar  
der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München  
(Vorstand: Univ.- Prof. Dr. E. Biemer)  
und  
Institut für experimentelle und onkologische Therapieforschung des  
Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München  
(Direktor: Univ.- Prof. Dr. B. Gänsbacher)

**Prälamination eines axialen Lappens mit Knorpel- und  
Vollhauttransplantat.  
Eine experimentelle Studie am Kaninchen.**

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

Isabelle Himsl

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. E. Biemer
2. Priv.-Doz. Dr. Chr. Höhnke

Die Dissertation wurde am 31.10.2005 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 17.05.2006 angenommen.

## Verzeichnis der Abkürzungen

A.: Arterie/ Arteria

Aa.: Arterien

Abb.: Abbildung

bzw.: beziehungsweise

C: Celsius

CI : Konfidenzintervall

ca. : circa

cm: Zentimeter

d: Tag/ Tage

d.h.: das heißt

DMSO: Dimethylsulfoxid

Fa.: Firma

g: Gramm

GmbH: Gesellschaft mit begrenzter Haftung

h: Stunde / Stunden

HE: Hämatoxylin-Eosin

H<sub>2</sub>O: Sauerstoff

IE: Internationale Einheiten

lt.: laut

i.m.: intramuskulär

i.v.: intravenös

Kap.: Kapitel

KG: Körpergewicht

Kg: Kilogramm

m: Mittelwert

max.: maximal

min: Minute/ Minuten

ml: Milliliter

mm: Millimeter

mmHg: Millimeter Quecksilbersäule

mmH<sub>2</sub>O: Millimeter Wassersäule

n: Anzahl

O<sub>2</sub>: Sauerstoff

opB: ohne pathologischen Befund

p: Signifikanzniveau

postOP: postoperativ

s.c.: subkutan

sec: Sekunde/ Sekunden

SD: Standardabweichung

Tab.: Tabelle

u.a.: unter anderem

V.: Vene/ Vena

Vv.: Venen

v.a.: vor allem

Wo.: Woche/ Wochen

x: Mittelwert

z.B.: zum Beispiel

µm: Mykrometer

§: Paragraph

	Seite
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Anwendungsgebiete der Knorpeltransplantation.....	1
1.2 Physiologie und Anatomie des Knorpels.....	6
1.3 Historischer Hintergrund.....	11
1.4 Methoden der Defektdeckung .....	24
1.5 Neovaskularisation.....	27
<b>2 Problemstellung und Zielsetzung.....</b>	<b>29</b>
<b>3 Material und Methodik.....</b>	<b>31</b>
3.1 Modellbeschreibung.....	31
3.2 Versuchstiere.....	33
3.3 Versuchsplan.....	34
3.4 Anästhesie .....	37
3.5 Operationsvorbereitung.....	38
3.6 Operationstechnik und Instrumentarium.....	39
3.6.1 Eingriff I.....	39
3.6.2 Eingriff II.....	46
3.7 Postoperative Versorgung.....	48
3.8 Schlusspräparation.....	49
3.9 Untersuchungsabschnitt.....	53
3.9.1 Klinisch-makroskopische Beurteilung.....	53
3.9.1.1 Eingriff I.....	53
3.9.1.2 Eingriff II.....	54
3.9.1.3 Schlusspräparation.....	55
3.9.2 Angiographie.....	56
3.9.2.1 Quantitative Auswertung.....	57
3.9.2.2 Qualitative Auswertung .....	59
3.9.3 Planimetrie.....	62
3.9.4 Histologie.....	65

3.9.5	Immunhistologie.....	70
3.9.5.1	Lösungen für die APAAP – Färbemethode.....	71
3.9.5.2	APAAP – Methode.....	73
3.9.6	Statistik .....	77
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>78</b>
4.1	Versuchstiere.....	78
4.2	Klinisch-makroskopische Ergebnisse.....	79
4.3	Angiographie.....	81
4.3.1	Quantitative Auswertung.....	82
4.3.2	Qualitative Auswertung.....	92
4.4	Planimetrie.....	101
4.5	Histologie.....	106
4.5.1	Knorpel.....	108
4.5.2	Perichondrium.....	109
4.5.3	Hautoberfläche.....	110
4.5.4	Subcutis.....	111
4.5.5	Haarfollikel.....	112
4.5.6	Hautanhangsdrüsen.....	113
4.5.7	Dermale Gefäße.....	114
4.5.8	Knorpel allgemein.....	115
4.5.9	Haut allgemein.....	116
4.5.10	Gefäße im Stanzbereich.....	117
4.5.11	Positionsvergleich.....	118
4.6	Immunhistologie.....	122
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>123</b>
5.1	Eignung des Tiermodells.....	123
5.2	Eignung des Studienaufbaus.....	124
5.3	Untersuchungsmethoden.....	127
5.3.1	Angiographie.....	127

5.3.1.1	Quantitative Auswertung .....	128
5.3.1.2	Qualitative Auswertung .....	130
5.3.2	Planimetrie.....	132
5.3.3	Histologie.....	133
5.3.3.1	Knorpelzustand.....	133
5.3.3.2	Perichondrium.....	133
5.3.3.3	Cutis.....	134
5.3.3.4	Subcutis.....	134
5.3.3.5	Haarfollikel.....	134
5.3.3.6	Drüsen.....	134
5.3.3.7	Dermale Gefäße.....	134
5.3.4	Deskriptive Verfahren.....	137
5.3.5	Klinische Beobachtungen.....	138
5.3.6	Immunhistologie.....	139
<b>6</b>	<b>Schlussfolgerung.....</b>	<b>140</b>
6.1	Qualität des Knorpels.....	142
6.2	Qualität der Haut.....	143
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>146</b>
<b>8</b>	<b>Verzeichnisse.....</b>	<b>149</b>
8.1	Literaturverzeichnis.....	149
8.2	Tabellenverzeichnis.....	168
8.3	Abbildungsverzeichnis.....	171
<b>9</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>175</b>
9.1	Curriculum vitae.....	175
9.2	Danksagung.....	180

## **1 Einleitung**

### **1.1 Anwendungsgebiete der Knorpeltransplantation**

In den letzten drei Jahrzehnten hat die Verwendung von autologem Knorpel zunehmend Verbreitung in der plastisch-rekonstruktiven Chirurgie gefunden.

Das Ziel autologer Knorpeltransplantationen ist die dreidimensionale und Funktion wiederherstellende Rekonstruktion nach ausgedehnter Tumorchirurgie, traumatisch bedingter Zerstörung oder im Rahmen einer kongenitalen Malformation.

Die Anwendungsbereiche von autologen Knorpeltransplantaten in dem genannten Fachgebiet sind vielfältig: Septorhinoplastiken, Mentoplastiken, Ohrkorrekturen und -rekonstruktionen, Tracheal- und Augenlidrekonstruktionen [9, 33, 65, 66, 91, 135, 146].

Dabei finden Knorpeltransplantate aus autologem Ohr-, Nasen-, Septum-, Ala- und Rippenknorpel breite Verwendung [123, 132]. Rippenknorpel wird im Bereich der plastisch - rekonstruktiven Chirurgie insgesamt seltener angewandt, da diese Methode mit einem ausgeprägten Hebedefekt, dem Auftreten von Brustkorbdeformität und perioperativen Komplikationen wie Pneumothorax, Wundheilungsstörungen und Infektionen einhergehen kann.

Das häufigste Einsatzgebiet von Knorpelgrafts stellt die Septum- und Rhinoplastik dar. Autologe Knorpelgrafts werden intensiv genutzt, um sowohl funktionelle als auch ästhetische Aspekte des Nasengerüsts zu korrigieren. Hierbei dient das Knorpelgewebe zur Kontur- und Volumenverbesserung als Sheen´s oder Erol´s graft im Bereich der Nasenspitze zwischen den crura mediale, bzw. am Nasenrücken oder als Knorpelgraft nach Cardenas-Camarena an den Alares majores [34, 123, 132]. Der hierzu verwendete Knorpel entstammt zum größten Teil dem Septum nasi, dem Ohrknorpel, dem Alaknorpel oder dem Rippenknorpel des Patienten. In zunehmendem Maße werden hierfür der im Folgenden vorgestellte crushed Knorpel oder mit chirurgischem Nahtmaterial bzw. umhüllenden Polymerlayern verbundene Knorpeldisks eingesetzt, da Irregularitäten der Nasenspitze und des Nasenrückens gemäß Shen und Elahi hiermit günstiger ausgeglichen werden [33, 124].

Ebenfalls häufige Anwendung findet Knorpelgewebe im Rahmen der Otoplastik bei kongenital oder traumatisch erworbenen (zum Beispiel nach Autounfall, nach fehlgeschlagenen Voroperationen oder nach Bissverletzungen) Veränderungen der Ohrhelix, die zu einer korrekturbedürftigen Konturveränderung geführt haben.

Ein weiteres Einsatzgebiet stellt die Augenlidrekonstruktion mit autologem Knorpelgewebe nach Trauma oder im Rahmen onkoplastischer Rekonstruktionen dar.

Unter den Teilbereich der Augenlidrekonstruktion fällt die heterotope Augenhöhlen- und Augenlidrekonstruktion von Ocampo et al. [98]. Die Konzeption und die Trainingsphase der hier vorgestellten Studie stehen in engem Zusammenhang mit dem Projekt der heterotopen Augenhöhlen und Augenlidrekonstruktion von Ocampo et al. [98]. Aus organisatorischen Gründen wurde zunächst das Projekt der heterotopen Augenlid- und Augenhöhlenrekonstruktion mit präformiertem Lappen durchgeführt. Darauf aufbauend wurde das Studiendesign unseres Versuchsvorhabens erarbeitet.

Die im Folgenden beschriebene Studie dient als Grundlagenuntersuchung zum Verhalten von autologem, heterotopem Knorpelgewebe hinsichtlich Gefäßaussprossung und Vitalität im chondrokutanen Lappen. Hierzu wird ein prälaminiertes kombinierter chondrokutaner Lappen im Versorgungsgebiet der A. epigastrica superficialis eingesetzt. Die Prälamination beinhaltet die Schichtung mehrerer unterschiedlicher Gewebe, um dadurch den gewünschten kombinierten Lappen zu formen. Die Variante des autologen, heterotopen Knorpeltransplantats wird in dem Versuchsvorhaben der Augenlid- und Augenhöhlenrekonstruktion von Ocampo et al. in einem präformierten Lappen als Tarsusersatz genutzt, um Formgebung und Stabilisierung des Neolides zu erreichen [98].

Dabei haben die von North im Jahre 1952 postulierten Bedingungen an das ideale Transplantatgewebe in diesem Zusammenhang bis heute Gültigkeit [97]:

- Das Transplantat sollte technisch unproblematisch und ohne wesentlichen Hebedefekt zu entnehmen sein.
- eine host versus graft Reaktion sollte vermieden werden.
- das Transplantat sollte selbst bei subkutanem oder submukösem Transplantatbett nicht perforieren oder dislozieren.
- das Transplantat sollte form- und volumenbeständig sein und keine Torsionsneigung aufweisen.



- das Transplantat sollte langfristig keiner Resorption unterliegen.

Gemäß diesen Postulaten erweist sich autologes Knorpelgewebe für die Erfordernisse der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie als geeignetes Transplantatmaterial. Autologes Knorpelgewebe ist in ausreichendem Maße verfügbar, technisch einfach zu entnehmen und morcellierbar. Es ist durch seine Festigkeit geeignet, stabile Kontur- und Stützfunktion zu übernehmen [20, 40]. Die Korrektur bzw. die Wiederherstellung von Knorpeldefekten durch autologes Knorpelgewebe bietet im Vergleich zu künstlichen Implantatmaterialien den Vorteil langfristiger Biokompatibilität ohne das Risiko einer Transplantatabstoßung. Der Einsatz autologer wie auch allogener Knorpeltransplantate in der rekonstruktiven Chirurgie ist aufgrund postoperativer Komplikationen wie subakuter oder chronischer Resorption, überschießender Narbenbildung, Deformität und Wundheilungsstörung am Entnahmeort Gegenstand zahlreicher Diskussionen. Dabei stellen akut-entzündliche Früh- bzw. Spätreaktionen gegenüber autologen oder allogenen Knorpeltransplantaten in Form von Verbiegung, Schrumpfung und Resorption auch heute noch ein ungelöstes Problem dar. Infektion, immunologische Reaktionen, die Auswahl des Knorpeltransplantats (autolog versus allogenes), Einflüsse des Transplantatlagers, die Größe des benötigten Transplantats und Ernährungsstörungen werden unter anderem als Ursache für die Misserfolge bei der Verwendung von Knorpeltransplantaten in der rekonstruktiven Chirurgie angeführt [51, 54, 59, 152]. Aufgrund seiner Gefäßlosigkeit und der Zusammensetzung der Knorpelmatrix galt Knorpel lange als „inertes“ Gewebe [55, 103]. Dies ist allerdings nach heutigem Kenntnisstand nicht der Fall. So haben Untersuchungen zum Nachweis von Autoantikörpern gegen Knorpelzellen bzw. Knorpelmatrixbestandteilen zur Aufklärung einer Knorpeldestruktion im Rahmen rheumatischer Erkrankungen geführt [21, 58, 99]. Naumann und Bujia (1997) konnten bei Patienten mit einer erfolglosen Knorpeltransplantation eine humorale Autoimmunreaktivität mit signifikant erhöhten Antikörpertitern gegen Chondrozyten und Kollagen vom Typ IX und XI nachweisen [92].

Neben den bereits genannten perioperativen Schwierigkeiten der Knorpeltransplantation kann sich intraoperativ die Modellierung natürlicher konkaver und konvexer Formen als technisch aufwendig darstellen. Für den langfristigen rekonstruktiven Erfolg der homologen Knorpeltransplantate hinsichtlich Form, Volumen und Stabilität ist der Knorpelerhalt infolge Resorption, Schrumpfung und Verformung gefährdet, wie

von vielen Autoren [3, 12, 31, 116, 119] beschrieben wird. Konventionelle Knorpelgrafts zeigen dabei histologisch regressive Veränderungen mit Volumenzunahme und Vergrößerung der Chondrozyten, gefolgt von Chondrozytenuntergang mit Zellkernverlust.

Diese histopathologischen Veränderungen werden der mangelnden Versorgung der Knorpelgrafts über das Perichondrium zugeschrieben, dabei wird gemäß Bujia et al. (1995) und Hartig et al. (1994) eine Kombination aus fibrotischer Kapselbildung und Resorption nach immunologischer Aktivierung induziert [13, 53]. Koshima et al. verwendeten 1997 mit Erfolg gefäßgestielte Haut-Knorpel-Hautlappen aus der Ohrconcha, um Knorpeldefekte der Trachea zu verschließen und postulierte, dass der im Gewebsverband adäquat gefäßversorgte Knorpel zu geringerer Resorption neigt als freie Knorpeltransplantate [71].

Die Sauerstoffversorgung des autologen Knorpeltransplantats im prälaminierten Lappen erfolgt im zeitlichen Verlauf über drei Mechanismen:

1. Das Knorpelgewebe ist im Wesentlichen auf die vom Perichondrium ausgehende O<sub>2</sub> - Plasmadiffusion angewiesen, wobei es lediglich einen O<sub>2</sub> - Bedarf von 1-2 % verglichen mit anderen Gewebetypen hat. Diese Form der Graftversorgung wird als supportive Funktion in den ersten 24-48 Stunden vor der eigentlichen Gefäßversorgung verstanden.
2. Nach 48-72 Stunden lässt sich stereomikroskopisch die Ausbildung von ersten mit präexistenten Gefäßen im Transplantatbett kommunizierenden Kapillaren nachweisen [22].
3. Anschließend erfolgt das Einsprossen von Kapillaren aus dem Gefäßbett des Transplantatlagers in das Knorpeltransplantat [129]. Es ist davon auszugehen, dass ein kombiniertes Transplantat längerfristig durch Plasmadiffusion nicht ausreichend erhalten werden kann, sondern auf eine erfolgreiche Revaskularisation aus dem Empfängerbett angewiesen ist [23]. Von Rudder mann et al. (1994) wurde gezeigt, dass das Einwachsen von Kapillaren in den Knorpelgraft mit einer signifikanten Repopulation von Chondrozyten einhergeht [119].

Daher ist die langfristige Sicherung der Vitalität, der Formstabilität und des Volumens eines Knorpeltransplantats entscheidend von der zur Verfügung stehenden Gefäß-

versorgung abhängig. Dies setzt eine ausreichende Kapillarisation zur Versorgung des bradytrophen Knorpelgewebes aus dem Empfängergefäßbett voraus.

In der letzten Dekade wurden unterschiedliche Präparationstechniken, die in Kapitel 1.3 beschrieben werden, angewandt, um eine ausreichende Formstabilität und Vitalität der Grafts sicherzustellen und die Resorptionsquoten zu minimieren.

In der vorgestellten Studie wird die Optimierung der Angiogenese bei der autologen und heterotopen Knorpeltransplantation untersucht.

Hierbei soll eine Technik, die als besonders hoffnungsvoll und pathophysiologisch vorteilhaft erscheint, mit der bekannten Technik der intakten, freien Knorpeltransplantation verglichen werden.

An gefäßlos entnommenem Knorpel wird durch zwei verschiedene Bearbeitungsvarianten versucht, die Neovaskularisation nach Reimplantation zu unterstützen und damit dessen Bestand langfristig zu sichern. Zur Vorbeugung von ischämisch bedingten Resorptionsvorgängen, Formveränderungen und Nekrose des Transplantats soll die Gefäßversorgung des Knorpels optimiert werden. Dazu wird die Vaskularisation von nativem Knorpel und mechanisch verändertem Knorpel mit reduzierter Diffusionsstrecke verglichen.

## 1.2 Physiologie und Anatomie des Knorpels

Das Knorpelgewebe gehört zu den Binde- und Stützgeweben. Funktionell zeichnet es sich durch:

- Druckelastizität,
- Fähigkeit, Gewicht zu tragen, zu stützen und Gleiten zu ermöglichen,
- sowie durch Form gebende Wirkung aus.

Morphologisch ist Knorpel durch die drei Bestandteile:

- Kollagen,
- Chondrozyten und
- einer weitgehend amorphen Grundsubstanz, in die die Zellen und die Kollagenfasern eingebettet sind, gekennzeichnet.

Die Chondrozyten liegen in Knorpelhöhlen und werden von Interzellulärsubstanz umgeben, die von den Knorpelzellen synthetisiert wird. Junge Chondrozyten sind meist abgeflacht, reife sind eher rund, ältere häufig hypertrophiert und groß. Knorpelzellen liegen überwiegend in isogenen Gruppen von bis zu zehn Chondrozyten vor, die durch mitotische Teilung entstanden sind und mit dem umgebenden Knorpelhof ein Chondron bilden.

Die funktionellen Eigenschaften des Knorpels sind an die Interzellulärsubstanz gebunden. Unterschiede im Aufbau der Interzellulärsubstanz bedingen das Vorkommen verschiedener Knorpelarten. Diese Grundsubstanz besteht zu etwa 60-70% aus Wasser, die Trockensubstanz setzt sich zu etwa 40-50% aus Hyaluronsäure, Proteoglykosaminoglykanen (Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat, Keratansulfat) und Kollagen, sowie etwa 10% Mineralsalzen zusammen. Um die Glykosaminketten formieren sich Wassermoleküle zu einer mehrschichtigen Hydrathülle, die u.a. dem Stofftransport dient. Auf dieses hohe Wasserbindungsvermögen geht auch die Druckelastizität des Knorpelgewebes zurück. Die Kollagenfibrillen, die über Wasserstoffbrücken mit den Glykosaminketten verbunden sind, bestehen im Wesentlichen aus Typ II - Kollagen. Diese wiederum bestehen gemäß Schiebler et al. aus Mikrofibrillen, die sich aus Tropokollagenmolekülen zusammensetzen [121]. Die Tropokollagenmoleküle bestehen aus drei gleichen  $\alpha 1$  – Typ II - Ketten im Sinne einer Tripelhelix, die einen hohen Anteil an Hydroxylysin und Hydroxyprolin enthalten, das die Tropokollagenmoleküle der Fibrillen untereinander verknüpft und Disaccharide bindet.

	Kollagenfasern Typ II	Elastische Fasern
Struktur	Faserbündel, unverzweigte Einzelfaser	Fasernetze, gefensterte Membranen, verzweigt
Durchmesser	Kollagenfaser: 1-20µm Kollagenfibrillen: 0,3-0,5µm Mikrofibrillen: 10-20nm	1-4µm
Lichtmikroskopie	wenig lichtbrechend	Stark lichtbrechend
Polarisationsmikroskopie	stark anisotrop	gering anisotrop
Elektronenmikroskopie	quergestreifte Mikrofibrillen	ohne Querstreifung
Physikalisches Verhalten	zugfest, Dehnbarkeit 5%	Zugelastizität, Dehnbarkeit 100-150%
Chemischer Aufbau	Hydroxyprolin,- lysin	Alanin, Leuzin, Isoleuzin, Va- lin, Prolin, Glyzin, Desmosin
Lösungsmittelverhalten	Quellung in Säure, Auflösung in Basen	unlöslich in Säuren, Basen, kochbeständig, Hydrolyse durch Elastase
Färbung	Hämatoxylin-Eosin, Azan	Resorcinfuchsin, Orcein
Vorkommen	Hyaliner, elastischer Knorpel	elastischer Knorpel, Gefäß- wand, Ligamenta

Tabelle 1: Charakteristische Unterschiede zwischen Kollagenfasern und elastischen Fasern, Schiebler et al. [121].

Das Perichondrium wird durch das an der Knorpeloberfläche gelegene Stratum zelluläre und dem knorpelfernen Stratum fibrosum gebildet. Hierbei handelt es sich um kollagenfaserreiches Bindegewebe mit einem hohen Anteil Fibroblasten ähnlicher Zellen, das den Knorpel nahezu überall bedeckt, eng mit ihm verbunden ist und kontinuierlich in die Knorpelgrundsubstanz übergeht. Eine Ausnahme besteht in der Perichondrium freien Oberfläche der Artikulationsfläche des Gelenkknorpels, die vom Stratum synoviale, der Synovia produzierenden Schicht, überzogen ist. Das Perichondrium ist insbesondere für das Wachstum und den Erhalt des Knorpels wichtig.

Knorpel gehört zu den wenigen gefäßfreien Geweben des Körpers. Seine Versorgung erfolgt durch kapillare Diffusion aus dem umgebenden Bindegewebe oder in Gelenken von der Synovia aus. Insgesamt gilt Knorpelgewebe als bradytrophes Gewebe. Hiermit hängt zusammen, dass der Stoffwechsel der Chondrozyten haupt-

sächlich auf anaerober Glykolyse basiert. Für den intrazellulären Transport der Substrate und Stoffwechselprodukte steht das in hohem Maße gebundene Wasser zur Verfügung. Das Knorpelgewebe ist lymphgefäßlos und hat keine nervale Versorgung.

Zu unterscheiden sind drei Knorpelarten:

	Hyaliner Knorpel	Elastischer Knorpel	Faserknorpel
Lage der Chondrozyten	Isogene Gruppen bis zu 10 Zellen	einzelnen oder in kleinen Gruppen	kleine Gruppen
Grundsubstanz	Reichlich Matrix, überwiegend Typ II Kollagen	Reichlich Matrix, elastische Fasern, Typ II Kollagen	wenig Matrix, sehr viele Kollagenfasern, Typ I Kollagen
Eigenschaften	Druckelastisch	Elastisch, biegsam	Wenig elastisch
Vorkommen	Häufigste Knorpelart, Rippen-, Gelenk-, Tracheal-, Nasenknorpel, embryonales Skelett, Epiphysenfugen, Kehlkopf: Cartilago thyroidea Cartilago cricoidea	Ohrmuschel, Wand des äußeren Gehörgangs, Tuba auditiva Kehlkopf: Cartilago epiglottica	Symphyse, Discus intervertebralis, Gelenkknorpel

Tabelle 2: Übersicht der drei unterschiedlichen Knorpelarten, Schiebler et al. [121].

Die zwei Mechanismen des Knorpelwachstums sind:

- das interstitielle Wachstum, hierbei kommt es zu einer mitotischen Vermehrung bereits vorhandener Chondrozyten und
- das appositionelle Wachstum. In diesem Fall entstehen Chondroblasten durch Differenzierung aus perichondralen Zellen.

Das interstitielle Wachstum erfolgt nur in der frühen Phase der Knorpelbildung und beginnt mit mitotischer Zellteilung. Mit Bildung der Grundsubstanz rücken die Zellgruppen immer weiter auseinander. Der Knorpel wächst zentrifugal und die Differenzierung schreitet von innen nach außen fort. Während die Grundsubstanz fester wird, wächst der Knorpel nur noch appositionell, wobei sich perichondrale Zellen teilen und sich in Chondroblasten umwandeln. Am Knorpelrand werden alle Übergangsformen

zwischen perichondralen Fibroblasten und Chondrozyten gefunden. Der Knorpel wächst bei appositionellem Wachstum durch Zunahme von außen [30].

Als Folge von regressiv-degenerativen Veränderungen werden die Chondrozyten größer, ihr Volumen nimmt zu und sie gehen später zugrunde. In der Interzellularsubstanz treten dann sogenannte Asbestfasern auf, d.h. zusammengelagerte Kollagenfasern, die durch Veränderung der Glykosaminoglykane und Wasserentzug sichtbar werden. Es können Kalkeinlagerungen entstehen, schließlich verbleibt verkalkter Restknorpel. Die Regeneration geschädigten Knorpels ist vor allem im Kindesalter möglich und nimmt mit zunehmendem Alter ab.

Der in der vorliegenden Studie verwendete elastische Knorpel ähnelt in mancher Hinsicht dem hyalinen Knorpel. Zwischen den Chondrozyten bestehen keine Unterschiede, die Chondrone im elastischen Knorpel sind allerdings zellärmer mit ca. 1-2 (max. 3) Zellen und kleiner als im hyalinen Knorpel. Beide Knorpelarten besitzen eine Grundsubstanz mit Kollagenfasern und –fibrillen vom Typ II. Zusätzlich findet sich aber in der Interzellularsubstanz des elastischen Knorpels ein reiches Netzwerk aus feinen elastischen Fasern. Diese sind verzweigt und bilden in der Regel Netze. Das Elastin enthält Prolin, Glyzin und zusätzlich hydrophobe Aminosäuren wie Alanin, Valin, Leuzin und Isoleuzin, zusätzlich Desmosin und Isodesmosin, jedoch -anders als Kollagen- wenig Hydroxyprolin und gar kein Hydroxylysin. Elastischer Knorpel ist biegsamer und dehnbarer als hyaliner Knorpel. Eine histologische Darstellung der elastischen Fasern im Knorpel ist mit Färbungen für Elastin möglich, wie beispielsweise mit Orcein und Resorcinfuchsin. Elastischer Knorpel ist ebenfalls von Perichondrium umgeben und wächst hauptsächlich durch Apposition. Elastischer Knorpel ist gegenüber degenerativen Veränderungen weniger empfindlich als hyaliner Knorpel [121].

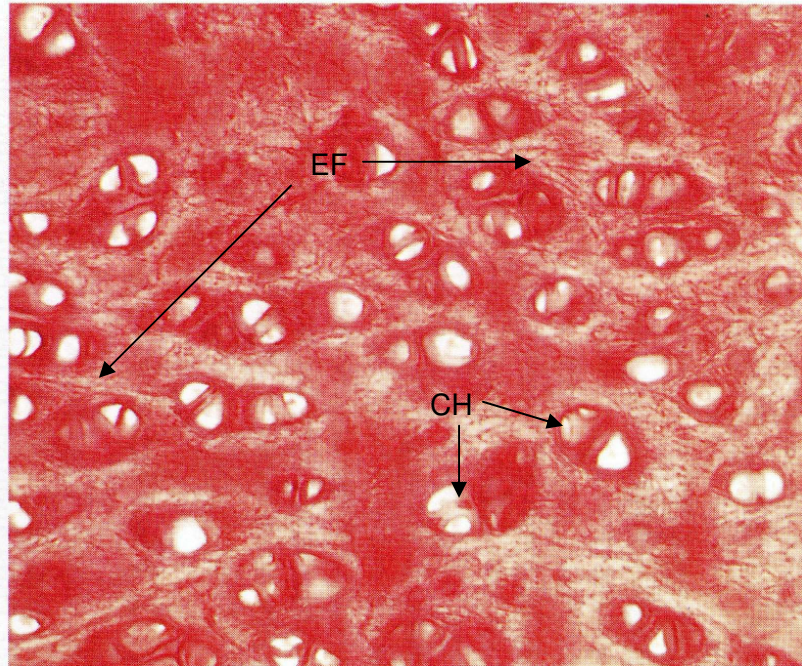


Abbildung 1: Elastischer Knorpel (Chondrozyt=CH), elastische Fasern (EF) bilden Fasernetzwerk im Interterritorium, Färbung nach Weigert, Vergrößerung 200fach aus Schiebler T, Schneider F (1991).



### 1.3 Historischer Hintergrund

Die ersten Berichte über den Einsatz von autologem Knorpel als formendes Element in der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie reichen bis in die zwanziger Jahre zurück. Gillies [43] berichtet bereits 1920 über das Phänomen der Distorsion autologer Knorpeltransplantate und brachte das Perichondrium damit ursächlich in Zusammenhang. Mowlem [89], der seinen Empfehlungen folgend perichondriumfreie Knorpeltransplantate einsetzte, schildert 1941, dass die mangelnde Formbeständigkeit der Grafts jedoch weiterhin zu hohen Revisionsraten führte. Das unerklärliche und unvorhersehbare Verhalten von frischem autologem Knorpel veranlasste die Chirurgen damals, von dessen Gebrauch zur Rekonstruktion Abstand zu nehmen.

Noch bis Mitte der 50er Jahre wurden vielfach heterologe Knorpeltransplantate in der rekonstruktiven Chirurgie vornehmlich bovinen Ursprungs genutzt [44]. Die ersten Versuche Knorpel zu behandeln wurden von New und Erich [94] 1941 unternommen. Durch das Abkochen von Knorpel vor der Implantation fehlte dem Gewebe die Tendenz sich zu wölben und zu falten. Dieser Bearbeitungsprozess sterilisierte das Knorpelgewebe und bereitete es für eine Aufbewahrung vor, führte jedoch gleichzeitig zur Denaturierung und zum Untergang der Chondrozyten. In den darauffolgenden Jahren wurde die Verwendung von konserviertem Knorpel zunehmend häufiger.

Im historischen Rückblick wird die Beschreibung der Methode der Knorpelpräparation von Gibson und Davis [40] 1969 als erster Meilenstein in der modernen Knorpeltransplantation angesehen.

Seitdem wurden große Bemühungen unternommen, überdauernde, formstabile, amplifizierende und verlässliche Knorpelmodelle einzuführen, die die herkömmliche Knorpeltransplantation mit und ohne Perichondrium ersetzen könnten.

Da die potentiellen Entnahmestellen für gefäßversorgten Knorpel begrenzt sind, werden zunehmend Techniken zur Herstellung neovaskularisierter Knorpelflaps entwickelt, um so die Anzahl möglicher Entnahmestellen zu erhöhen.

Die im Laufe der letzten 2 Jahrhunderte entwickelten Techniken des Knorpelersatzes

gliedern sich in 7 große Kategorien:

1. Freie Knorpeltransplantate
2. Konservierte Knorpelpräparate
3. Bearbeiteter Knorpel
4. Freie, gefäßgestielte, chondrokutane composite grafts, prälaminierte Lappen, präfabrizierte Lappen
5. Isoliertes Perichondrium
6. Knorpel tissue engineering
7. Anwendung von Wachstumsfaktoren

zu 1. Freie Knorpeltransplantate

Die erstmalige autologe Knorpeltransplantation wurde 1865 von Bert im Tierversuch durchgeführt [6]. 1896 erprobte König die autologe Knorpeltransplantation erstmals am Menschen [70]. 1920 führte Gillies und 1926 Mannheim et al. die ersten histologischen Studien an implantiertem Rippenknorpel durch. Gillies zeigte, dass sich freier Knorpel mit unilateralem Perichondriumüberzug zur Perichondrium tragenden Seite verformt [43, 80]. Als Schlussfolgerung aus seinen Studien empfahlen sie die komplette Entfernung des Perichondriums. Obwohl dieses Prinzip große Verbreitung fand, waren die Ergebnisse durchwegs unbefriedigend.

1938 versuchte Mowlem der Knorpelverformung entgegenzuwirken, indem er die Knorpelgrafts vorübergehend in die abdominale Wand einsetzte und sie erst in einer zweiten Operation an den Bestimmungsort transplantierte [89]. Doch auch hier kam es zu Verformungen, die Korrekturoperationen bedingten, welche wiederum den Knorpel für weitere Formänderungen anfällig machten.

Die Unvorhersehbarkeit des Verhaltens von frischem, autologem Knorpel führte zur vorübergehenden Aufgabe dieser Methode.

Schließlich gelang es Gibson und Davis im Jahre 1958, die Eigenverformung der Grafts aus menschlichem Rippenknorpel anhand verschiedener Schnittebenen und Richtungen positiv zu beeinflussen [40]. David wies 1970 das eigenständige Wachstum von heterotop und orthotop und Glenn 1975 von autolog und homolog transplantiertem Ohrknorpel am Kaninchen nach [27, 46]. In der Rekonstruktion des unteren und oberen Augenlids konnten Kiyoshi et al. [65] 1989 mit Ohrconcha Knorpelgrafts, die unilateral auf der konkaven Seite mit Perichondrium beschichtet waren, gute Ergebnisse hinsichtlich Stabilität und Ästhetik erzielen. Ebenfalls signifikant bessere

Ergebnisse erzielten Mutaf et al. 1994 bezüglich des Knorpelwachstums mit am Kaninchenohr entnommenen Grafts durch den Einsatz von Hautexpandern [90]. In einer Studie von Gubisch et al. (1995) wurde die Chondrozytenvitalität nach orthotoper, submuköser Septumimplantation am Kaninchenmodell geprüft [48]. Nach einem Beobachtungszeitraum von 3 Monaten konnte histologisch eine komplette Einheilung nachgewiesen werden. Ein vielversprechender Ansatz wurde von Neu im Jahr 2000 vorgestellt, indem er durch die Kombination von Conchaknorpel mit Ethmoidalknochen zur Korrektur des Septum nasi das Materialangebot erhöhte und zusätzlich eine höhere Belastbarkeit erzielte als durch alleinigen Gebrauch von Conchaknorpel [93]. Die Untersuchung von Wiseman et al. (2000) zeigte, dass autologe, native, in mehreren Schichten applizierte, durch Naht verbundene und unverbundene Knorpelgrafts in vivo am Kaninchenmodell gut toleriert wurden [154]. Ein geringer Flächen- und Volumenzuwachs wurde am ehesten auf die Bindegewebsbildung in den Randbereichen zurückgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Verbindung durch Nähte keinen Einfluss auf das postoperative Volumenergebnis hat. Die Wirkung von ummantelnden Medien wurde von Yilmaz et al. [155] (2001) anhand von Surgicel®, einer Membran aus oxigener Cellulose geprüft. In 18 Kaninchen wurde nativer und nativ ummantelter Ohrknorpel subkutan implantiert. Die mit Surgicel® ummantelte Knorpelgruppe zeigte einen signifikanten Anstieg an Kollagen Typ II, jedoch keinen Hinweis auf Proliferation im Vergleich zum nativen Knorpel. Viterbo et al. (2003) berichteten von ästhetisch guten Resultaten mittels freier Ohrknorpelgrafts zur Kinn- aufbauplastik an 28 Patienten [146].

### zu 2. Konservierte Knorpelpräparate

Die ersten Versuche wurden von O'Conner und Pierce im Jahre 1938 unternommen, indem sie Septorhinoplastiken mit vorgekühlten, autologen Knorpelgrafts an 375 Patienten durchführten [99]. Dabei wurden Resorptionsraten von unter 0,5% festgestellt. Auch Straith und Slaughter (1941) beschrieben an 100 durchgeführten Septorhinoplastiken geringe Resorptionsraten des gekühlten Knorpels von 6% über einen Beobachtungszeitraum von 4,5 Jahren [131]. Alternativ wurde der Knorpel durch Erhitzen präimplantatorisch von New und Erich 1941 denaturiert und erfolgreich implantiert. Das Knorpelgewebe wurde dadurch sterilisiert und zur Konservierung vorbereitet und verlor durch diese Behandlung seine störende Verformungstendenz, jedoch auch seine Vitalität [94]. Von Padgett und Stephenson (1948) wurden bereits

deutlich höhere Resorptionsraten der konservierten Knorpeltransplantate von bis zu 33% angegeben [102].

Donald et al. erkannten 1986, dass mit Formaldehyd, Merthiolat, Cialit oder durch Bestrahlung konservierter und damit avitaler Knorpel progressiver Resorption im Gewebe unterliegt und sich wie ein spezifisches Antigen verhält [31]. Eine Metaanalyse von Donald und Col von 1981 zeigte bereits eine deutliche Überlegenheit von nativem, autologem Knorpel gegenüber konserviertem Knorpel hinsichtlich der Resorptionsrate [32]. In beiden Gruppen zeigen sich ähnliche Infektions- und Abstoßungsraten. Aus dieser Übersichtsarbeit geht die Methode der Bestrahlung als Verfahren mit der geringsten Resorptionsrate hervor. Adlington et al. postulierten 1992 anhand eines Mausmodells, dass nach Devitalisierung des Rippenknorpels durch Bestrahlung, Formaldehyd, Glutaraldehyd und Alkohol nach einer medianen Follow-up-Zeit von einem Jahr die Methode der Präparation keinen Einfluss auf histologisch verifizierbare Fibrosereaktion und Resorptionsrate hat [1]. Jüngere Studien von Guyuron et al. und Rudderman et al., die im nächsten Unterpunkt näher erläutert sind, zeigen, dass nach bestimmten Fixationsschritten und Konservierungsbedingungen konservierter autologer Knorpel und frischer autologer Knorpel prozentual vergleichbare Volumina besitzen [49, 119]. In einer nachfolgenden Studie von Bujia et al. (1994) wurden isolierte Chondrozyten und Knorpelgewebe in unterschiedlichen Zellkulturmedien wie RPMI 1640, Ham F-12 und DMEM 4500, sowie Formaldehyd und NaCl-Lösung über einen Zeitraum von 150 Tagen inkubiert. Der Nachweis vitaler Zellen erfolgte durch intravitale Färbung histologischer Schnitte, sowie Färbung der isolierten Chondrozyten und Darstellung der Zelladhäsion in Monolayerkultur. In Formaldehyd konservierter Knorpel war bereits nach 10 Tagen komplett avital, in NaCl inkubierter Knorpel nach 30 Tagen. In den o.g. Zellkulturen behielt Knorpel mehr als 85% seiner Vitalität über den gesamten Beobachtungszeitraum. Es konnte gezeigt werden, dass vitaler Knorpel in Zellkulturmedien einen Zeitraum von 5 Monaten erfolgreich überdauert [12]. 1995 untersuchten Bujia et al. das Verhalten von vitalem und avitalem, konserviertem Knorpel zur Trachearekonstruktion am Kaninchen. Dabei wies Formaldehyd konservierter Knorpel deutliche Entzündungszeichen auf, während in Kulturmedien konservierter Knorpel keine Entzündungszeichen zeigte. Daher wurden von Bujia et al. (1995) im Folgenden vitale Knorpelgrafts den chemisch konservierten vorgezogen [14]. In einer vergleichenden Studie von Keskin et al. (2000) wurde zur Rekonstruktion laryngotrachealer Stenosen der Einsatz von in

Alkohol konserviertem homologem Knorpel mit autologem Knorpel am Kaninchenmodell verglichen. Nach der sechswöchigen Beobachtungsphase der 20 operierten Neuseelandkaninchen zeigte sich, dass autologer Knorpel mit 95% Chondrozytenvitalität gegenüber 30% bei der homologen Gruppe deutlich vorteilhafter war. Auch die Resorptions-, Fibrose- und Nekroserate war signifikant geringer, eine Reepithelialisierung zeigte sich in 100% der autologen Transplantate verglichen mit 65% in der homologen Vergleichsgruppe. Jedoch waren die Knorpelneusynthese und die Integration in das umliegende Gewebe in beiden Gruppen nur gering ausgeprägt. Insgesamt erschienen autologe Knorpelgrafts den in Alkohol konservierten homologen grafts zur laryngotrachealen Rekonstruktion überlegen [63].

Die Konservierung verschiedener Gewebe durch Kryoverfahren für spätere chirurgische Anwendungen wurde in den letzten Jahren häufig praktiziert. 1957 berichtete Gibson und 1958 Gibson und Davis, dass eine Vorbehandlung mit Glycerol, sowie ein anschließendes langsames Abkühlen nicht vor den negativen Folgen einer Kryokonservierung von minus 15°C schützten [40, 42]. 1987 berichtete Schachar von einer Überlebensrate der Chondrozyten von 30-40% bei stufenweiser, langsamer Kryobehandlung [120]. Kawabe und Yoshinao erreichten 1990 jedoch lediglich 19% Vitalität in Knorpelschichten und steigerten sie auf 34% durch Stanzung der Knorpelscheiben [60]. Die größten Transplantationserfolge nach Kryokonservierung wurden mit epithelialen Geweben erreicht, so z.B. mit Hautgewebe gemäß Billingham und Medawar (1952) und palatinaler Mukosa gemäß Weinstein et al. (1976) [7, 151]. Trotz früher ermutigender Erfolge mit kryokonservierten Knorpelallotransplantaten im Tierversuch und am Menschen sind Spätkomplikationen aufgrund degenerativer Veränderungen, wie Studien von Hellmich (1982) und Kastenbauer (1983) zeigten, häufig [54, 59]. Ein wichtiger Faktor im Verhalten dieser Knorpelgrafts ist der Erhalt der Vitalität und damit der Funktion der Chondrozyten. 1995 wurde in der Studie von Kremer und Bujia durch vorherigen enzymatischen Abbau der Knorpelmatrix durch Kollagenase Typ II und Hyaluronidase die Dimethylsulfoxidpenetration erleichtert und die Permeabilität der Knorpelmatrix durch enzymatische Andauung erhöht [72]. Kryokonservierung des so vorbehandelten Knorpels führte zu einer Chondrozytenvitalität von 20%. In einer Folgestudie von Bujia et al. konnte 1995 eine Vitalität von 94% am nativen Septumknorpelpräparat als Kontrollgruppe, 80% in Zellkulturmedien und im Vergleich lediglich 4% vitale Zellen kryokonserviert ohne DMSO und 3% kryokonserviert mit DMSO nachgewiesen werden [13]. Im Zellfunktionstest, mit dem die Adhäsions-

onsfähigkeit der Chondrozyten in Zellkulturmedien nach 5 Tagen untersucht wurde, wuchsen 90% des nativen Knorpels, 75% der in Kulturmedien konservierten Zellen und nur 1% aus beiden kryokonservierten Gruppen normal. Diese Untersuchung zeigte, dass die Kryokonservierung zu deutlicher Nekrosebildung der Grafts führt. Die Eliminierung dieser Nekrosen erfolgt über Bindegewebsersatz sowie Funktionseinbußen [13]. 1998 ergab eine Studie von Tojo et al. im Gegenzug eine deutliche Überlegenheit von kryokonserviertem, allogenen Knorpel im direkten Vergleich mit nativen, allogenen Knorpelgrafts zur trachealen Defektdeckung im Hundemodell [139]. Davon leiteten sie eine verminderte Antigenität durch Kryokonservierung ab.

Die ausgeprägte Heterogenität der Ergebnisse der Kryokonservierung in der Literatur beruht vermutlich auf den unterschiedlich verwendeten Knorpelarten (viele der vorangegangenen Untersuchungen wurden an Gelenksknorpel durchgeführt) bzw. auf den unterschiedlichen Nachweismethoden. Kryokonservierter Knorpel gilt weiterhin als günstiges Füllmaterial in der rekonstruktiven Chirurgie, jedoch nicht an Lokalisationen, die mechanischem Stress unterliegen.

### zu 3. Bearbeiteter Knorpel

Cottle war 1951 der erste, der von dem Gebrauch von gemahlenem, morcelliertem Knorpel, der auch als crushed Knorpel bezeichnet wird, berichtete. Dieser wurde von ihm zur Rekonstruktion des Nasenseptums eingesetzt [26]. Seitdem erschienen zahlreiche Veröffentlichungen zu diesem Thema. Die Vorteile von crushed Knorpel liegen in der idealen Modellierbarkeit, Anpassungsfähigkeit und Unauffälligkeit der Graftfränder. Die erzielten Ergebnisse waren jedoch uneinheitlich.

Bujia (1994) untersuchte diese kontroversen Aussagen und führte sie auf komplexe immunologische Umbauvorgänge in crushed Knorpel zurück [11].

In einer Crossover-Studie von Rudderman et al. wurde 1994 die Knorpelvitalität und die Volumenpersistenz von nativem, nativ crushed, konserviertem und konserviert crushed autologem Knorpel am Kaninchenohr untersucht. Knorpel donor site und Implantationsort waren jeweils identisch. Die Dauer der Konservierung vor Implantation betrug jeweils 4 Monate. In einem zweiten Eingriff wurden der konservierte und der konservierte crushed Knorpel an die donor site eingesetzt. Zeitgleich wurde kontralateral nativer und nativer crushed Knorpel etwas versetzt zur donor site implantiert. Nach einer dreimonatigen Beobachtungsphase erfolgte die Auswertung.

Dabei wies nativer Knorpel eine 100%ige Knorpelvitalität und eine Volumenpersistenz von 94% auf, konservierter Knorpel erreichte eine 91%ige Volumenpersistenz und vitale Knorpelzellen waren lediglich in Randzonen in der Umgebung von eingesprossetem Gefäßendothel nachweisbar. Ebenso wies der konservierte crushed Knorpel lediglich in Randgebieten in der Nähe von eingesproßten Gefäßendothel vitale Knorpelzellen auf und erreichte eine Volumenretention von 74%. Nativer crushed Knorpel wies 70-90% vitale Chondrozyten auf und erreichte eine Volumenpersistenz von nur 69%. Insgesamt zeigte sich der native Knorpel überlegen in Bezug auf Knorpelvitalität und Volumenkonstanz. Jedoch wurde auch hier auf das günstigere ästhetische Ergebnis bei crushed Knorpel hingewiesen [119]. Erwähnenswert im Hinblick auf die vorliegende Studie ist die Beschreibung einsprossender Gefäße, die zu einer signifikanten Repopulation von Chondrozyten in ihrem Versorgungsgebiet führte. In einer aktuellen Arbeit von Elahi et al. wurden 2003 retrospektiv von 1995 bis 2000 die Ergebnisse von 67 Patienten ausgewertet, die eine Rhinoplastik mit Surgicel® umhülltem morceliertem Knorpel in der Technik nach Erol (2000) erhalten hatten [33, 34]. Als vorteilhaft stellten sich die einfache Präparation des Septums bzw. Conchaknorpels, das ausreichend zur Verfügung stehende Donorsubstrat und die Vermeidung von Konturirregularitäten am Zielort heraus. Die Komplikations- und Revisionsrate war vergleichbar mit anderen Techniken, die Patientenzufriedenheit war hoch und es wurden weder Dislokation noch Konturunebenheiten der Grafts verzeichnet. Insgesamt erwies sich die mit Surgicel® gepackte Knorpeldisktechnik als eine effektive Technik zum Wiederaufbau verschiedener Nasenregionen.

zu 4. Freie, gefäßgestielte, chondrokutane composite grafts, prälaminierte Lappen, präfabrizierte Lappen

Zur laryngotrachealen Rekonstruktion bei subglottischer Stenose wurde von Glatz et al. (2003) an 18 Kaninchen ein kombinierter prälaminiertes, präfabrizierter gefäßgestielter Lappen erfolgreich implantiert [45]. Mit Verbreitung der mikrochirurgischen Anastomosentechnik wurde seit der Mitte des letzten Jahrhunderts zur Deckung mehrschichtiger Gewebsdefekte zunehmend die Technik der freien, gefäßgestielten chondrokutanen composite grafts angewandt. Dabei werden Vollhautanteile mit darunter befindlichen Strukturen und versorgendem Gefäßstiel verwendet. So gelten aurikuläre chondrokutane Lappen aufgrund ihres vergleichbaren Hautcolorits, -textur und -dicke als ideales Gewebe zur Defektdeckung im Nasenbereich.

Anfangs wurden nichtvaskularisierte composite grafts implantiert, die jedoch nach Converse (1950) und McLaughlin (1955) größenbeschränkt waren und zu starker Schrumpfung neigten [24, 86].

Im Folgenden wurde Haut aus der Regio aurikulomastoidea als lokaler Lappen bei Lewin (1950), Tanzer (1965) und anderen Autoren verwendet, oder nach einer delay Operation an einem Gefäßstiel an entferntere Lokalisationen transferiert [75, 79, 134, 149, 150]. 1976 konnten Fujino et al. erstmals und Wada et al. (1979) den erfolgreichen Einsatz eines posterioren aurikularen Lappens basierend auf dem posterioren aurikularen Gefäßbündel zur Nasenrekonstruktion demonstrieren [38, 148]. Orticochea beschrieb im Jahr 1980 den Transfer bilateraler Concha composite grafts zur kompletten Nasenrekonstruktion [101]. Die orale Defektdeckung mit posterioren aurikularen Grafts wurde von Kolhe und Leonard (1987) beschrieben [69, 74]. Von Parkhouse und Evans (1985) wurde die Verwendung eines anterioren auricularen composite flaps zum Wiederaufbau der Ala nasi beschrieben [106]. Koshima et al. (1997) verwendeten mit Erfolg Gefäß gestielte Haut-Knorpel-Haut-Lappen aus der Ohrmuschel um Tracheadefekte zu verschließen [71]. In ihrem Fallbericht bestätigten sie, dass der adäquat gefäßversorgte Knorpel zu geringerer Resorption neigt als freie Knorpeltransplantate.

Voy verwendete 1985 zur Herstellung freier Omentum majus Lappen autologen, mittels Cialit konservierten Knorpel und Fremdmaterialien wie Proplast® als Trägermaterial. In allen verwendeten Medien wurde nach Abschluss der Beobachtungsphase eine deutliche Neovaskularisation ohne signifikante Resorption nachgewiesen [147].

Einen weiteren Schritt zur Lösung des Problems der Gefäßversorgung von Knorpeltransplantaten unternahmen Arden et al. (1995), indem sie das Überleben von chondrokutanen Grafts durch vorangehende Gefäßimplantation am Kaninchenohrmodell verbesserten [3]. Hodin et al. verwendeten 1996 freie composite Grafts aus Ohrknorpel und dorsaler Ohrhaut, um Nasenrekonstruktionen im Bereich der Nasenflügel durchzuführen und erzielten damit gute Ergebnisse [56]. Zur Deckung von Ohrdefekten, die das kraniale Drittel mit einbeziehen, benutzten Yotsuyanagi et al. (1998) bei 7 Patienten erfolgreich chondrokutane, gefäßgestielte Lappen [156].

Ebenso berichtet Pribaz et al. (1999) von an 5 Patienten erfolgreich durchgeführten prälaminierten Haut und Knorpel Unterarm free flaps zur Rekonstruktion komplexer zentraler Gesichtsdefekte [108]. In einer Studie von ten Koppel et al. wurde 1998 trabekuläre entmineralisierte Knochenmatrix von einem gefäßgestielten Ohrperi-



chondriumlappen ummantelt und in unterschiedlich vaskularisierten Empfängerarealen des Kaninchens implantiert [137]. Nach einer Beobachtungsphase von 3 und 6 Wochen wurde die höchste Inzidenz von neugebildetem Knorpel in der Gruppe der gefäßgestielten Perichondriumlappen, die an einem sehr gut vaskularisierten Ort implantiert wurden, gemessen. In einer aktuellen, retrospektiven Arbeit an 15 Patienten von Keck et al. (2003) werden chondrokutane aurikulare Grafts mit lokoregionären Transpositionshautlappen kombiniert [61].

### zu 5. Isoliertes Perichondrium

Es wurden Versuche unternommen, die Qualitäten des dünnen, faltbaren, knorpelbildenden und stark vaskularisierten Perichondriums zu nutzen, um die Knorpelresorption bei autologer Knorpeltransplantation zu vermeiden.

Bereits 1975 verfolgten Ritsilä et al. die Idee, dass in heranwachsenden Tieren freie perichondrale Grafts eine chondrogene Potenz haben, ähnlich der Fähigkeit freier periostaler Grafts zur Osteogenese [114, 115], was in zahlreichen Studien bestätigt wurde [113, 118, 141, 142, 143]. Sie untersuchten am Kaninchenmodell die Chondrogenese freier perichondraler Grafts aus dem Ohr, die an iatrogen gesetzte Defekte im Bereich der Femurartikulationsfläche des Kniegelenks gesetzt wurden. Nach einem Zeitraum von zwei Jahren konnte mikroskopisch neugebildeter Knorpel, der dem hyalinen Umgebungsknorpel entsprach, nachgewiesen werden. Ritsilä et al. führten diese Untersuchungsreihe fort und zeigten 1994, dass bei der Chondrogenese von frei transplantiertem Ohrperichondrium am Kaninchen das Umgebungsgewebe, die Gefäßversorgung des Empfängerbettes und konsekutiv die Oxygenisierung entscheidenden Einfluss auf das Verhalten mesenchymaler Zellen haben [112].

Ramon rekonstruierte 1994 tracheale Defekte an Kaninchen zu gleichen Teilen mit vaskularisiertem und avaskulärem Ohrperichondrium, wobei sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Knorpelneubildung ergaben [110]. Von Clevens et al. (1995) wurde vaskularisiertes, aurikuläres Perichondrium im Kaninchenmodell zur Rekonstruktion eines Tracheadefektes erfolgreich mit histologisch nachgewiesener Chondrogenese implantiert [19]. Von ten Koppel et al. wurde 1998 gezeigt, dass freie Perichondriumlappen auf trabekulärer demineralisierter Knochenmatrix Neoknorpel generieren können, einen Implantationsort mit günstiger Gefäßversorgung vorausgesetzt [137]. In einer Perichondriumstudie von Yotsuyanagi et al. wurde

1999 an 12 Kaninchen aus Perichondrium generierter Knorpel mittels Thermoplastplatten zu einem menschlichen Ohr geformt. In 8 der 12 Tiere konnte histologisch vom Perichondrium ausgehende Knorpelbildung nachgewiesen werden, die erfolgreich zur Entwicklung einer rigiden Struktur mit der Form eines menschlichen Ohres geführt hatte [157].

### zu 6. Knorpel tissue engineering

Die Konservierung von Knorpel für die Transplantation stellt in dessen chirurgischer Anwendung eine weitere Herausforderung dar. Chemische Konservierungsverfahren, wie in Unterpunkt 2 erläutert, wurden durch vitale Konservierung, wie sie Bujia et al. (1994) beschreiben und durch gefäßgestielte chondrocutane Lappen übertroffen. Tissue engineering stellt eine vielversprechende Therapiemodalität dar, um fehlenden Knorpel zu ersetzen [12]. Die Methode, wie sie von Koch und Gorti (2002) beschrieben wird, umfasst die Asservierung von Knorpel, die enzymatische Isolierung der Chondrozyten und die Amplifikation der Knorpelzellen auf einer zweidimensionalen Monolayerkultur. Anschließend werden resorbierbare Polymerscaffolds mit den Zellen beimpft und diese in rotierenden Bioreaktoren kultiviert [68]. Bujia et al. verwendeten 1995 lebende Zellkulturchondrozyten zur erfolgreichen Larynxrekonstruktion am Kaninchen. Im Unterschied zu einer ausschließlichen Zellamplifikation auf Monolayersystemen, hängt die Knorpelentwicklung entscheidend von der dreidimensionalen Anordnung der Zellen und von der Synthese der extrazellulären Matrix ab. Hierzu benutzte Bujia et al. (1995) resorbierbare Polymervliese aus Polyglykansäure and Polylactat als Trägermaterial in einem Fließkulturmedium. Mit diesem Verfahren behielten Chondrozyten ihren differenzierten Phänotyp und die Fähigkeit zur Neusynthese von Knorpelmatrix [14]. In der Fortentwicklung dieser Technik wurde autologer tissue engineered Knorpel auf vorgeformten Glycogenpolymeren kultiviert, um bereits geformte Knorpelimplantate zu generieren. Britt und Park konnten 1998 mit dieser Technik am Kaninchenmodell erfolgreich Knorpelwachstum histologisch nachweisen. Nach einer Beobachtungszeit von 6 Monaten wurde in 71% der insgesamt 7 auszuwertenden Tiere eine signifikante Abnahme der Knorpelvitalität, sowie eine Abnahme der biomechanischen Eigenschaften von bis zu 76% verglichen mit nativem Knorpelgewebe dokumentiert [10]. Durch Zusatz von Wachstumsfaktoren in die Kulturmedien konnte 2001 in einer Studie von van Osch et al. demonstriert werden, dass der

Phänotyp in multiplizierten Ohrchondrozyten wiedergewonnen wurde. In einem weiteren Optimierungsschritt wurden die Chondrozyten auf alginathaltigem E210, einem planen Polyglactinvlies kultiviert [144]. Mit dieser Technik konnten Marijnissen et al. (2002) hohe Konzentrationen an Glycosaminoglykanen und Kollagen Typ II nach zweimonatiger subkutaner Implantation am Mausmodell nachweisen. Der Zusatz von Alginat erhöhte die Formstabilität des Grafts und führte zu keiner nennenswerten Entzündungsreaktion, Kapselbildung oder Beeinflussung der Knorpelmatrixprotein-synthese im Beobachtungsintervall [82]. Rodriguez et al. konnten 1999 zeigen, dass bovine Chondrozyten die Fähigkeit besitzen, tissue engineered Knorpel in einer definierten Form, wie z.B. einem menschlichen Ohr, zu generieren. Humane Chondrozyten wurden auf ihre Multiplikationscharakteristika, auf ihre Kultivierbarkeit in dreidimensionalen Strukturen sowie ihre Fähigkeit, elastische Knorpelmatrix zu produzieren, untersucht. Das von 12 Patienten im Alter von 5-17 Jahren entnommene Knorpelmaterial wurde 12 Wochen inkubiert. In zweiwöchigen Abständen wurden so kultivierte Chondrozyten auf ein dreidimensionales polyglykolacetathaltiges Gerüst aufgetragen und am Mausmodell nach einem Zeitraum von jeweils 8 Wochen histologisch untersucht. In 71% der beimpften Polymere ließ sich Knorpelgewebe nachweisen, dieses war nach immunhistochemischer Auswertung vereinbar mit elastischer Knorpelmatrix [116].

Die Adhäsionseigenschaften von tissue engineered Knorpel an nativem Knorpel, wurden von Silverman et al. (2000) untersucht [128]. Dazu wurde eine Fibrinpolymer-Chondrozytenschicht ummantelt von zwei nativen Knorpelscheiben in 15 Mäuse subkutan implantiert. Nach einem Beobachtungszeitraum von 6 Wochen zeigte sich in dem Zwischenraum Neoknorpelmatrix dem nativen Knorpel ohne Kapselbildung adhärent. Mit dieser Studie ließ sich eindrucksvoll dokumentieren, dass auf diese Art verbundene Knorpelteile, in verschiedenen biomechanischen Stresstests untersucht, signifikant größeren Kräften standhalten können als mit einfachen Fibrinmedien verbundene Knorpelschichten. In einer vergleichenden Studie am Mausmodell konnte 2001 von Panossian et al. gezeigt werden, dass bei subkutaner Applikation von Ohr- und Gelenkknorpel vom Schwein das Volumen der Knorpelprobe mit zunehmender Konzentration an Knorpelzellen und Inkubationszeit wächst. Dabei fiel auf, dass subkutan implantierter Ohrknorpel histologisch und biochemisch im Glycosaminoglykan- und DNA-Gehalt nativem Ohrknorpel ähnlicher als Gelenkknorpel ist. Dies wurde dem lokalen Umfeld isolierter Chondrozyten aus unterschiedlichen Quellen zuge-

schrieben. Das subkutane Umfeld von nativem Ohrknorpel passt sich günstiger den injizierten Ohrchondrozyten als dem injizierten Gelenkknorpel an. Es wurde vermutet, dass biochemische und immunologische Prozesse des Knorpelgewebes im Transplantatbett die Proliferation differenzierter Chondrozyten induzieren [104]. Erfolgreiches Knorpel tissue engineering wird u.a. von Lavezzi et al. (2002) [73] und erstmals von der Projektgruppe um Vacanti et al. (1997) in Boston am Mausmodell anhand der Herstellung eines Knorpelpolymergerüsts in Form eines menschlichen Ohrs am Mausmodell berichtet [16].

### zu 7. Wachstumsfaktoren

Im Knorpelzellmodell aus Rattengelenkknorpel wurden von Kloosters und Bernier (2005) die verschiedenen Signaltransduktionswege von Tumor Nekrosefaktor alpha (TNF-alpha) und dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) auf die Chondrozyten-Funktionen untersucht. Dabei wiesen TNF-alpha und EGF additive Effekte hinsichtlich der Reduktion von Aggrecan und Typ II-Kollagen mRNA auf, hatten jedoch keinen Einfluss auf eine Aktivierung der NF-kappa B oder Proteinkinase C Signaltransduktion [67].

An autologen osteochondralen Transplantaten am Kniegelenk von Schafen wurde der Einfluss von Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF) auf die Integration des Transplantats untersucht. An 10 Schafen ließ sich in einer Beobachtungsphase von 6 Monaten eine radiologisch solide Osteointegration nachweisen, es fehlte jedoch eine makroskopische wie mikroskopische Integration der Knorpelpartie [126].

Der Transformationswachstumsfaktor-beta (TGF-beta) reguliert eine Vielzahl Chondrozytenzell Aktivitäten. Die Bindung von TGF-beta an seinen Zelloberflächenrezeptor aktiviert verschiedene Signalkaskaden, von denen der TGF-beta Smad Signaltransduktionsweg der am ausführlichsten untersuchte ist. TGF-beta aktiviert jedoch ebenso Proteinkinasen wie die mitogenaktivierende Proteinkinase (MAPK), die Proteinkinase A und C (PKA, PKC) und moduliert über weitere Interaktionen mit verschiedenen anderen Signaltransduktionswegen die Genexpression in Chondrozyten. Während der enchondralen Knochenformation ist TGF-beta ein wichtiger Inhibitor der terminalen Differenzierung der Epiphysenfugenchondrozyten. Die Reifung der Chondrozyten wird über den Smad- und den Wnt-Signaltransduktionsweg sowie den Transcriptionfactor Runx2 reguliert [77].

Besonders im Zusammenhang mit Knorpel tissue engineering Modellen wird der Einsatz von Knorpelwachstumsfaktoren untersucht. Die Behandlung einer dreidimensionalen mesenchymalen Stammzellkultur auf einem polycaprolacton Nanonetzes als Träger mit TGF-beta einem Transformationswachstums Faktor-beta wies eine vergleichbar hohe Chondrogenese sowie Synthese von knorpelassoziierter extrazellulärer Matrix auf verglichen mit mesenchymalen Stammzellkulturen in Zellaggregaten auf herkömmlichen Pellets [76].

Im Rahmen des vorliegenden Forschungsprojektes wurde auf den Einsatz von Fibroblastenwachstumsfaktor verzichtet.

### 1.4 Methoden der Defektdeckung

Das Ziel aller Lappenplastiken ist die dauerhafte Defektdeckung und Rekonstruktion mit einer an die umgebende, intakte Haut angepassten Hauttextur, Pigmentierung und Dicke des subkutanen Gewebes. Dabei soll der Hebedefekt funktionell und ästhetisch möglichst wenig Nachteile bieten. Der Defekt-deckende Hautlappen soll wiederum möglichst komplikationslos und ohne ausgeprägte Schrumpfungstendenz anwachsen [57].

In der plastisch-rekonstruktiven Chirurgie gliedert sich die rekonstruktive Defektdeckung prinzipiell in die zwei Teilbereiche: Transplantation und Transposition von Haut und ggf. Fett-, Muskel-, Knochen- und Knorpelgewebe.

Als Transplantation wird die räumliche Verlagerung von Gewebe nach Abtrennung von der Blutversorgung bezeichnet.

Bei der Hauttransplantation wird die Spalthaut- und die Vollhauttransplantation unterschieden. Das Spalthauttransplantat besteht aus Epidermis und variablen Anteilen der Dermis. Entnahmestellen sind in der Regel in ausreichendem Maße vorhanden und heilen spontan nach Reepithelialisierung ausgehend von Epithelinseln um Haarfollikel. Spalthauttransplantate wachsen im Empfängerbett rasch an, weisen jedoch eine hohe Schrumpfungstendenz und oftmals eine nicht zufriedenstellende Textur und Pigmentierung auf [57].

Dagegen ist das kosmetische Ergebnis eines Vollhauttransplantats, das anatomisch aus Epidermis und der kompletten Schichtdicke der Dermis besteht, meist günstiger. Die Spenderregion muss allerdings chirurgisch versorgt werden, was aus kosmetischen Gründen die Verfügbarkeit limitiert. Insgesamt jedoch heilen Vollhauttransplantate im Vergleich zu Spalthauttransplantaten in Abhängigkeit der Perfusion und der Kontamination des Empfängerbetts schlechter an [57].

Als Transposition wird die Verschiebung von Hautlappen unter Beibehaltung der Gefäßversorgung verstanden. Die Spenderregion befindet sich dabei entweder in unmittelbarer Nähe zu dem zu deckenden Defekt oder in größerem Abstand davon, so unterscheidet man räumlich zwischen einem „local flap“ und einem „distant flap“.

Der „local flap“ wird je nach angewandter Technik in einen Verschiebelappen, einen Rotationslappen und einen Interpolationslappen unterschieden [84].

Der „distant flap“ wird je nach angewandtem Verfahren eingeteilt in einen direkten Lappen, in einen Rolllappen und in einen freien Lappen.

Allen genannten Techniken ist gemeinsam, dass die gebildeten Hautlappen keine definierte Gefäßversorgung aufweisen, sondern sogenannte „random pattern flaps“ darstellen, die über den dermalen und subkutanen Gefäßplexus versorgt werden [57].

Um jedoch eine sichere Perfusion des Transplantats und damit ein komplikationsloses Anwachsen sicherzustellen, wurde eine Weiterentwicklung zur Herstellung von Hautlappen mit definiertem Gefäßstiel notwendig. Die potentiellen Spenderregionen werden dabei nach der Art der Blutversorgung eingeteilt, wie z.B. myokutane oder fasziokutane Lappen. In diesem Zusammenhang weisen fasziokutane und myokutane Lappen eine hohe Zuverlässigkeit auf, da die anatomische und die vaskuläre Basis getrennt voneinander lokalisiert sind, im Vergleich zu „random cutaneous flaps“, in denen sich die Gefäßebene in der zu transplantierenden Hautebene befindet. Beispiele für myokutane Lappen sind z.B. der Latissimus dorsi Lappen mit A. und V. thorakodorsalis als Gefäßstiel oder der „transverse rectus abdominis myocutane flap“, der von A. und V. epigastica superficialis superior versorgt wird. Ein Beispiel für einen fasziokutanen Lappen stellt der Radialislappen dar, der zentral über der A. und V. radialis gelegen ist. Myokutane und fasziokutane Lappen weisen jedoch eine hohe Hebedefektmorbidität auf [84].

Durch die Entwicklung sogenannter präfabrizierter Lappen, in die ein Zentralgefäß implantiert wird, konnte die nachteilige Limitierung aufgrund von anatomischen Gegebenheiten aller bisher genannten Lappentechniken weiter reduziert werden [96]. Bisher war der freie Gewebettransfer durch die Notwendigkeit einer vorhandenen axial verlaufenden Gefäßversorgung der Spenderareale begrenzt [158]. Für die Methode der Präfabrikation mit Implantation eines Zentralgefäßes eignet sich als Gefäßführendes Gewebe das Omentum majus, Faszie, Muskelgewebe und isolierte Blutgefäße. Von diesen Gefäßträgern geht die Neovaskularisation des zu transplantierenden Hautlappens aus [130]. Als vorteilhaft erweist sich in diesem Zusammenhang die Zunahme an potentiellen Spenderregionen und die Möglichkeit, schlanke Hautlappen

mit axialer Gefäßversorgung für die Rekonstruktion von Regionen mit nur wenig subkutanem Gewebe (z.B. Gesicht) zu entnehmen. Da der Gefäßstiel aller natürlichen, axial versorgten Hautlappen aus tiefen Schichten stammt, weist der zu entnehmende Flap mit dem adhärennten Muskel- oder Fettgewebe eine deutliche, nachträglich nicht ausdünnbare Schichtdicke auf [88]. Ebenso wie der gefäßgestielte Lappen weist der präfabrizierte Lappen eine definierte Gefäßversorgung auf, die für die Hauttransplantation an das Empfängergefäßsystem reanastomosiert wird [84].

Der gestielte, ebenso wie der präfabrizierte Lappen kann aufgrund der eigenen Gefäßversorgung auch in vorgeschädigtem oder kontaminiertem Gewebe eingesetzt werden.

Im Unterschied dazu wird zur Erstellung eines prälaminierten Lappens ein in situ verlaufender, axialer Gefäßträger (z.B. Faszie, Muskelgewebe oder Gefäße) genutzt, um ein Hauttransplantat zur Versorgung aufzunehmen und in zweiter Sitzung an den Zielort transferiert zu werden.

In der vorliegenden Studie wurde die Technik der Prälamination angewandt. Als Zentralgefäß wurde die A. und V. epigastrica superficialis gewählt, um im zweizeitigen Ansatz ein Knorpel- Vollhauttransplantat zur Versorgung aufzunehmen.



## 1.5 Neovaskularisation

Die Neovaskularisation im prälaminierten Knorpel-Vollhautlappen verläuft nach folgenden Prinzipien:

Dem Prozess der Neovaskularisation liegt die Angiogenese, d.h. die Bildung neuer kapillärer Blutgefäße zugrunde. Angiogenese findet während der embryonalen Entwicklung statt und während einiger physiologischer und pathologischer Abläufe im adulten Individuum, wie z.B. der Wundheilung, chronisch entzündlicher Vorgänge und auch bei Tumorwachstum. Im Rahmen der Tumorentwicklung ist die Angiogenese im Unterschied zu den übrigen Formen nicht selbstlimitierend [78].

Die Bildung neuer Gefäße folgt einem angiogenen Stimulus, wie z.B. das Vorliegen einer ausgeprägten Gewebeischämie oder ein chronisch-entzündlicher Prozess [36, 88, 105]. Daraufhin wird aus kapillären Endothelzellen Plasminogen-Aktivator und Kollagenase freigesetzt. Dies hat eine Lyse der Basalmembran der Stammgefäße zur Folge, durch die die Endothelzellen zielgerichtet in den perivaskulären Raum migrieren. Durch mitotische Zellteilung kommt es zur kapillaren Gefäßaussprossung mit Lumenbildung. Nach Aufzweigung und Anastomosierung der kapillaren Gefäßsprosse sowie Ausbildung einer Basalmembran setzt der Blutfluss ein [37]. Angiogene Faktoren werden z.B. von Tumorzellen, aktivierten Makrophagen und T-Lymphozyten sezerniert [36, 37, 88, 125, 138]. Nach heutigem Kenntnisstand gelten Angiogenesewachstumsfaktoren (vascular endothelial growth factor VEGF), Angiopoetine, Ephrine und Fibroblastenwachstumsfaktoren als entscheidende Faktoren im komplexen Regelwerk der Angiogenese [4]. Die vascular endothelial growth factors (VEGFs) sind die Angiogenese und die mikrovaskuläre Permeabilität stimulierende Proteine. Sie spielen eine zentrale Rolle im Rahmen der physiologischen und pathologischen Neovaskularisation. Die Signaltransduktion erfolgt über die Rezeptoren Flt-1/ VEGFR1 und Flk-1/VEGFR2. VEGFs können in vielen Isoformen generiert werden, die wesentlichen humanen Isoformen sind V121, V165, V189 und V206. Die verschiedenen Isoformen scheinen ähnliche Funktionen zu haben, differieren aber in ihren Bindungsaffinitäten an extrazelluläre Matrix. In einer Untersuchung von Ancelin et al. (2002) konnte gezeigt werden, dass die Steroidhormone 17 beta-Estradiol und

Progesteron die VEGF-Expression steigern [2]. VEGF und der basale Fibroblasten Wachstumsfaktor bFGF führen zu einer Aktivierung der Expression der Calcium aktivierten Kaliumkanäle (IKCa1) in humanen Endothelzellen der Vena umbilicalis. Diese Hochregulation der IKCa1 scheint eine entscheidende Rolle für die Endothelzellproliferation und Angiogenese in vivo zu spielen [47]. Angiopoetine sind Proteine, die wichtige Kofaktoren der Angiogenese darstellen. In einer Studie von Carlevaro et al. (1997) konnte in vitro und am Tiermodell das isolierte Protein Transferrin als wesentlicher Kofaktor der Neoangiogenese in hypertrophiertem Knorpel während der enchondralen Ossifikation nachgewiesen werden [18].

Die Neovaskularisation im Knorpel-Vollhautlappen kann durch den Einsatz von angiogenen Faktoren wie z.B. endothelial cell growth factor (ECGF) oder basic fibroblast growth factor (bFGF) verbessert werden [64].

Im Rahmen des vorliegenden Forschungsprojektes wurde auf den Einsatz von Angiogenesewachstumsfaktoren verzichtet.

## 2 Problemstellung und Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, nach Präparation eines prälaminierten Lappens mit autologer, heterotoper Knorpel- und Vollhauttransplantation und unterschiedlicher Präparation des Knorpelgewebes das Ausmaß der Neovaskularisation im transplantierten Knorpel zu evaluieren.

Dabei wird die Angiogenese in Abhängigkeit von der Größe des Knorpeltransplantats beurteilt, um daraus die Gefäßversorgung in kombinierten Knorpel-Vollhaut-Lappen zu untersuchen.

Zu diesem Zweck werden in einer kontrollierten Studie zwei verschiedene Bearbeitungstechniken zur Stanzung des Knorpels miteinander verglichen.

Als Hauptvariable wurde in den drei Untersuchungsgruppen der transplantierte Knorpellayer in unterschiedlichem, definiertem Ausmaß perforiert. Dies geschieht in der Absicht, eine größtmögliche Bindegewebs- und Kapillareinsprossung zu ermöglichen und dadurch eine Reduktion der Diffusionsstrecke zu erreichen. Als klinischer Indikator für eine erfolgreiche Revaskularisierung dient das Einheilen und Anwachsen eines auf den Knorpellayer transplantierten, avaskulären Vollhauttransplantats.

Dieses Vorgehen zur Förderung der Kapillareinsprossung wurde bisher in keiner kontrollierten Studie untersucht.

Die durchgeführte Studie soll über die Kapillareinsprossung Auskunft geben, indem:

- die Qualität und Quantität der Neoangiogenese durch angiographischen und histologischen Nachweis dokumentiert wird.
- die Vitalität des autologen Knorpeltransplantats histologisch untersucht wird.
- in einem sekundären Eingriff Vollhaut auf die Knorpelschicht appliziert und die Vitalität und Fläche der Transplantathaut im prälaminierten Lappen klinisch und histologisch untersucht wird.

Die Erforschung des Verhaltens von Knorpel im Weichgewebe, sein Einfluss auf die darüberliegende Haut und die Gefäßeinsprossung in diesen kombinierten Lappen, sowie die Untersuchung der spezifischen Vor- und Nachteile waren das Ziel dieser kontrollierten, prospektiven tierexperimentellen Studie.

Um vergleichbare, verlässliche und reproduzierbare Aussagen über die Vaskularisation des Knorpels im präformierten Lappen treffen zu können, ist diese zunächst im nativen, unmanipulierten Gewebe zu untersuchen.

Anschließend wurden das Auftreten von Gefäßen und die Knorpelbildung im bearbeiteten Knorpel histologisch an van Gieson- und Hämatoxylin–Eosin-gefärbten Schnitten studiert. Immunhistochemische Methoden wurden ebenfalls herangezogen, um Lokalisation, Aufbau und Umgebung der Gefäße zu untersuchen.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, einen chondrokutanen Lappen herzustellen und in Abhängigkeit vom Ausmaß der iatrogenen Perforation des cartilaginären Layers die transcartilaginäre Neovaskularisation desselben zu induzieren und zu untersuchen.

In dieser tierexperimentellen Studie werden die Bedingungen, unter denen eine Prälamination eines mehrschichtigen dünnen Lappens möglich ist, untersucht. Darauf aufbauend soll die Revaskularisation und die Vitalität der im zweizeitigen Ansatz auf den Knorpel aufgetragenen Haut in Abhängigkeit der verschiedenen implantierten Knorpelgewebsvarianten geprüft werden. Das Überleben des Hautgrafts hängt dabei anfangs entscheidend von der Plasmadiffusion aus dem Empfängerbett zum Graft ab, bevor ein permanenter kapillärer Anschluss die Blutversorgung übernimmt [112]. Daher wurde als Implantationsort die Bauchregion subkutan in der Pinna gewählt, die wie bereits von ten Koppel et al. (1998) beschrieben, als mäßig gut vaskularisiert gilt [137].

Als Empfängerbett für den Graft diente am Implantationsort die axiale Gefäßversorgung durch die Arteria und Vena epigastrica superficialis, die zu einem freien Lappentransfer genutzt werden können.

### 3 Material und Methodik

#### 3.1 Modellbeschreibung

Zur Untersuchung der vorgegebenen Parameter (siehe Kapitel 2) wurde eine kontrollierte, prospektive tierexperimentelle Studie durchgeführt.

Als Versuchstier wurde das Kaninchen gewählt. An 10 Kaninchen wurde die Prälamination eines chondrokutanen Lappens durchgeführt. Alle Eingriffe wurden durch denselben Operateur ohne Assistenz ausgeführt. Im Vorfeld der Studie wurde die Durchführung eines prälaminierten, chondrokutanen Lappens kontrolliert erlernt.

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß § 8 Abs.1 des Tierschutzgesetzes vom 17.02.1993 durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

Die vorgestellte Studie dient der Bestimmung der Neoangiogenese im chondrokutanen Transplantat im Hinblick auf die Verwendung in präfabrizierten Lappen.

Die zwei zu erprobenden Knorpelaufbereitungstechniken der Knorpelperforation haben eine optimierte Vitalität und damit eine formelastische Beständigkeit des Knorpeltransplantats zum Ziel.

Mit der zusätzlich applizierten Vollhaut würde der chondrokutane Lappen in verschiedenen Bereichen der plastisch - rekonstruktiven Chirurgie eingesetzt, wie der genannten Lidrekonstruktion und der Nasen- und Ohrmuschelrekonstruktion.

Um die vorhandene Gefäßversorgung, die Neoangiogenese und die makroskopische und histopathologische Vitalität des chondrokutanen Lappens darzustellen wurden folgende Untersuchungsverfahren angewandt:

1. Klinisch- makroskopische Beurteilung
2. Angiographie
3. Planimetrie
4. Lichtmikroskopische Histologie
5. Immunhistochemie

Die genannten Untersuchungsverfahren sollen Aufschlüsse liefern über:

- zu 1. Wundheilungsstörung, vitale Hautfläche, vitale Knorpelfläche, Deformierung des Knorpels
- zu 2. Gefäßdurchmesser, Gefäßverteilung
- zu 3. Quantifizierung der vitalen Hautfläche
- zu 4. Knorpel/ Perichondriumzustand, Hautzustand, Gefäßdarstellung, Entzündungsreaktion, Fremdkörperreaktion
- zu 5. Neoangiogenese, Gefäßverteilung

Die erhobenen Daten sind folgende:

- a) Quantitative Daten: Gefäßverteilung (Angiographie)  
vitale Hautfläche (Planimetrie)
- b) Semiquantitative Daten (Scoreverfahren): Vitalität Haut (Histologie)  
Vitalität Knorpel (Histologie)
- c) Qualitative Daten: Intraoperative/ klinische Beobachtungen der Knorpelfläche, Knorpeldicke, Wundheilung

### 3.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienen weibliche Chinchilla-Bastard-Kaninchen (Fa. Charles River GmbH, Sulzfeld).

Diese stellen ein Standardmodell für In-vivo-Untersuchungen am Knorpel dar [45, 88, 133].

Das Körpergewicht der Versuchstiere betrug zum Zeitpunkt des ersten Eingriffs durchschnittlich 2,37kg (Minimum 2,0kg, Maximum 2,7kg), zum Zeitpunkt des zweiten Eingriffs durchschnittlich 2,76kg (Minimum 2,4kg, Maximum 3,1kg), zum Zeitpunkt des dritten Eingriffs durchschnittlich 3,11kg (Minimum 2,6kg, Maximum 3,6kg).

Die Tiere wurden in Einzelkäfigen auf Lochblech gehalten und zweimal wöchentlich umgesetzt. Futter (Kaninchenhaltungsdiät: Altromin®) und Wasser aus einer Nippeltränke erhalten die Tiere ad libitum. Die Beleuchtung des Stallraumes wird über ein Programm mit automatischem Tag-Nachtrhythmus geregelt (12 Stunden hell [max. 500 Lux], 12 Stunden dunkel). Die Lufttemperatur beträgt 21- 23°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-70%.

Insgesamt gingen 13 Tiere in die Studie ein.

### 3.3 Versuchsplan

Von den 13 Kaninchen wurde an 12 Tieren die Knorpelentnahme an der Dorsalseite der Ohrconcha durchgeführt, bei 9 Kaninchen am linken Ohr, bei 3 Kaninchen am rechten Ohr. Ein Kaninchen verstarb während der Narkoseeinleitung vor dem ersten Eingriff an einer Asystolie.

Das entnommene Knorpelpräparat wurde in jeweils drei gleich große 2x2cm messende Quadrate geteilt und wies eine Knorpeldicke von durchschnittlich 0,5mm (0,4-1,0mm) auf. Diese Knorpelfläche wurde gewählt, da sie einerseits groß genug sein sollte, um ein ausgewogenes Verhältnis zwischen nativer Knorpelfläche und gestanzter Fläche bei gleichbleibender Stabilität zu erreichen. Andererseits war das gesamte zu entnehmende Knorpelvolumen unter Berücksichtigung des zu erwartenden Hebedefektes limitiert. Das entnommene Knorpelgewebe wurde in drei Gruppen eingeteilt. Zwei Gruppen wurden präimplantatorisch in jeweils unterschiedlicher Technik bearbeitet. Die dritte Gruppe blieb unbearbeitet und diente als Kontrollgruppe. Der Knorpel, der im Folgenden als Gruppe GL bezeichnet wurde, erhielt jeweils 9 zirkuläre Perforationen mit einem Durchmesser von jeweils 4mm. Der Knorpel, der im weiteren Verlauf als Gruppe KL benannt wurde, wurde 20mal gestanzt. Diese Stanzungen wiesen jeweils einen Durchmesser von 1,5mm auf. Die Anordnung der beiden transcartilaginären Perforationstypen wurde durch das Anlegen einer Schablone kontrolliert und für den gesamten Versuchsablauf beibehalten. Die Fläche eines Kreises berechnet sich aus  $\pi$  mal Radius<sup>2</sup>. Somit ergibt sich für die Gruppe GL eine gestanzte Fläche von  $9 \times 12,566 = 113,1\text{mm}^2$ , für die Gruppe KL eine gestanzte Fläche von  $20 \times 1,767\text{mm}^2 = 35,3\text{mm}^2$  in einem Knorpelquadrat mit einer Fläche von jeweils  $20 \times 20\text{mm} = 400\text{mm}^2 / 4\text{cm}^2$ . Berechnet man das Verhältnis gestanzter Knorpel zur gesamten Knorpelfläche pro Gruppe, ergibt sich für die Gruppe GL eine gestanzte Knorpelfläche von 28,3%, für die Gruppe KL eine perforierte Fläche von 8,8%. Die intakte, native Kontrollgruppe wies 0% gestanzte Fläche auf. Diese Perforationsflächen von ca. 10% und 30% der Gesamtknorpelfläche pro Untersuchungsgruppe wurden gewählt, um einerseits mit einem Modell zu arbeiten, das eine geringgradige und eine erhebliche Entfernung von Knorpelvolumen hinsichtlich des Parameters der Gefäßeinsprossung miteinander vergleicht. Andererseits sollte dabei die formgebende, tragende und stabilisierende Funktion der Knorpelstruktur nicht beeinträchtigt werden. Betrachtet man das einzelne Perforationsareal von ca.  $12,6\text{mm}^2$  in der



Gruppe GL verglichen mit 1,8mm<sup>2</sup> in der Gruppe KL, zeigt sich auch hier ein deutlicher Unterschied mit einem Flächenverhältnis von 1:7. Mit dieser Untersuchungsanordnung sollte der Grad der transcartilaginären Neovaskularisation in Abhängigkeit der Größe des transmuralen Knorpeldefekts evaluiert werden. Nach Einteilung des entnommenen Knorpelgewebes in die drei Gruppen GL, KL und Kontrollgruppe wurden diese drei Untersuchungsgruppen im Rahmen des ersten Eingriffs in jedes der 12 Tiere implantiert. Diese autologe, heterotope Knorpeltransplantation erfolgte im Bereich der seitlichen Bauchwand epifasciel auf das Gefässbett der A. epigastrica superficialis. Die drei Knorpelgruppen wurden dabei in permutierter Reihenfolge implantiert. Nach einem Intervall von vier Wochen wurde bei allen Tieren im Rahmen eines zweiten Eingriffs ein 6x2cm messendes Vollhautareal an der kontralateralen Bauchwandseite präpariert. Diese Vollhaut wurde in drei jeweils 2x2cm messende Teiltransplantate geteilt und in der gleichen Operation auf die bereits vier Wochen in situ befindlichen drei Knorpelgruppen transplantiert. Dazu wurde über jedem der drei Knorpelgruppen jeweils ein 2x2cm großer Hautdefekt geschaffen und die Vollhauttransplantate im Niveau auf die drei Knorpelgruppen transplantiert. Dieser zweizeitig geschaffene chondrokutane Lappen wurde nach einer vierwöchigen Beobachtungsphase in situ mit Kontrastmittel perfundiert, exzidiert und angiographisch, histologisch sowie planimetrisch untersucht.

Die Beobachtungszeit in situ betrug für das Knorpelgewebe 8 Wochen, für das Vollhauttransplantat 4 Wochen.

Die 10 Kaninchen, die der Auswertung mit Angiographie, Planimetrie und Histologie zugeführt wurden, hatten die Nummer 79, 80, 91, 109, 110, 111, 112, 133, 170 und 171.

Eine Besonderheit stellt die Untersuchung des chondrokutanen Lappens an zwei Tieren dar, der nach Durchführung der drei aufeinander folgenden Eingriffe einer qualitativen, immunhistochemischen Auswertung zugeführt wurde.

Die zwei Tiere, die immunhistochemisch ausgewertet wurden, hatten die Nummer 37 und 93.

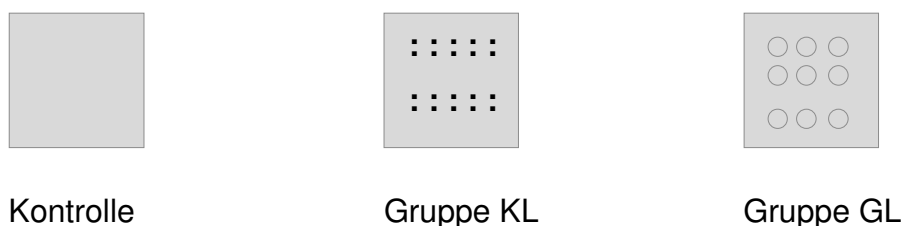


Abbildung 2: Schematische Darstellung der drei Knorpelgruppen.

Tiernr.	Gruppen		
79	GL	KL	KO
80	GL	KL	KO
91	GL	KL	KO
109	GL	KL	KO
110	GL	KL	KO
111	GL	KL	KO
112	GL	KL	KO
133	GL	KL	KO
170	GL	KL	KO
171	GL	KL	KO

Tabelle 3: Gruppeneinteilung.

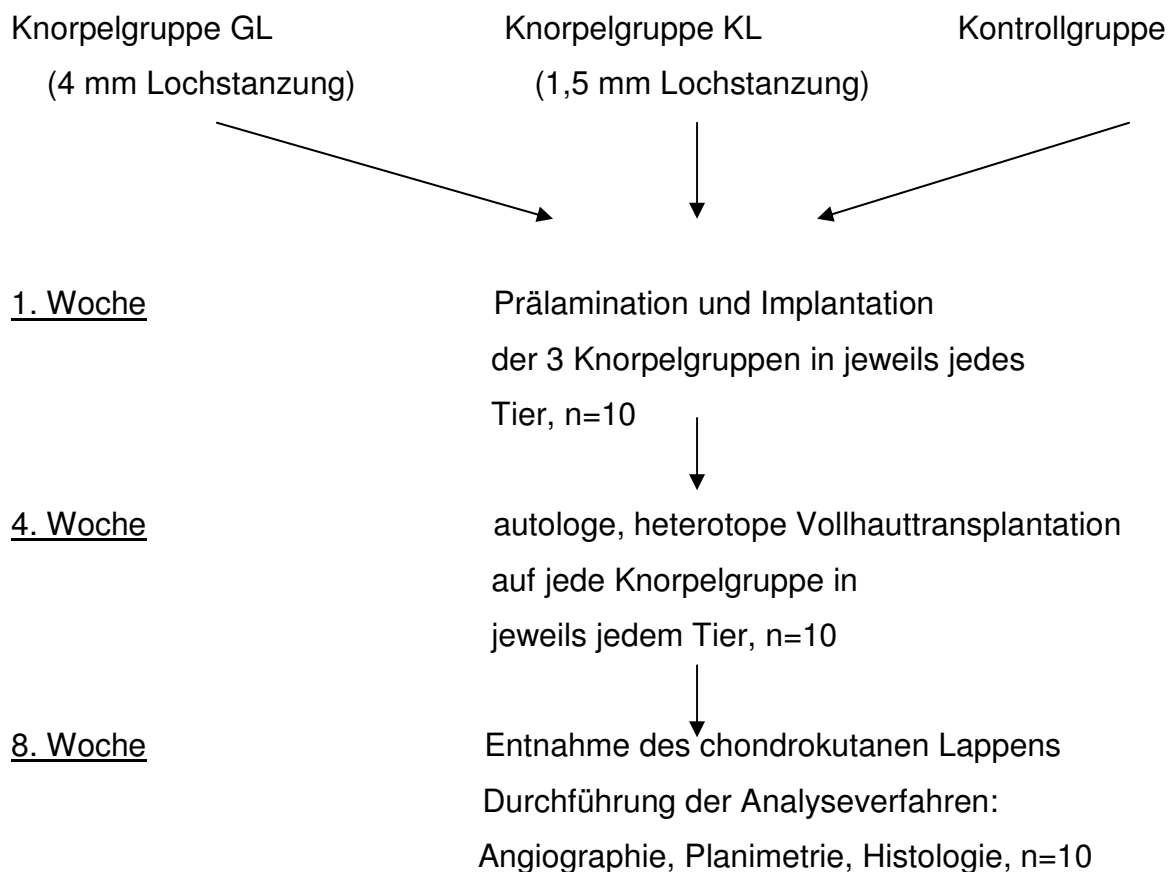


Tabelle 4: Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs mit Implantation der drei Untersuchungsgruppen (GL, KL und Kontrollgruppe) in jeweils jedes Tier.

### 3.4 Anästhesie

Alle operativen Eingriffe erfolgten in Allgemeinanästhesie. Diese wurde bei allen Tieren mit einer initialen i.m. (Oberschenkel) Mischinjektion mit folgenden Wirkstoffen und Dosierungen eingeleitet:

- Xylazinhydrochlorid/ Xylapan® (1ml ≈ 23,3mg, Chassot Ag Bern, CH) 5mg/kg KG und
- Ketaminhydrochlorid/ Narketan® (1ml ≈ 115,3mg, Chassot GmbH, Ravensburg) 50mg/kg KG.

Das intraoperative, kontinuierliche Anästhesiemonitoring erfolgte über ein Pulsoxymeter, das an der Zungenspitze angebracht wurde. Die Tiere atmen während der Operation spontan. Zur intraoperativen Aufrechterhaltung der Narkose wurde Ketaminhydrochlorid 50mg/kg KG 5fach verdünnt und Xylazin 5mg/kg KG 5fach verdünnt als Erhaltungsdosis bedarfsadaptiert i.v. verabreicht. Hierzu wurde ein Venenverweilkatheter Venflon® (Fa. Ohmeda Helsingborg, Durchmesser 0,8mm) in die V. auricularis gelegt.

Intraoperativ erfolgte eine kontinuierliche intravenöse Volumensubstitution mit Ringer Lösung® Delta Pharma (Boehringer Ingelheim, Pfullingen, Deutschland). Zusätzlich wurde als Lokalanästhesie an der Knorpelentnahmestelle am Ohr 0,5ml Mepivacainhydrochlorid/ Scandicain® 2% (Astra, Wedel) zweifach verdünnt subkutan verabreicht.



Abbildung 3: Infiltrationsanästhesie am Ohr.

Die Narkosedauer betrug beim ersten Eingriff ca. 170-240min, beim zweiten Eingriff ca. 160-220min, es folgte jeweils ein ausgedehnter Nachschlaf. Die Narkosedauer des letzten Eingriffs betrug ca. 190-340min.

### 3.5 Operationsvorbereitung

Die Kaninchen wurden an der Außenseite beider Ohren, jeweils ein Ohr zur Knorpelentnahme und eines zur Anlage einer intravenösen Verweilkanüle, sowie im Bereich des gesamten Abdomens, der Inguinalregion und der Innenseite beider Oberschenkel rasiert. Die Tiere wurden dann in Rückenlage in leichter Spreizstellung der Vorder- und Hinterbeine auf der Unterlage locker fixiert.

Um ein Auskühlen während der Operationen und dem folgenden Nachschlaf entgegenzuwirken, wurden die Tiere auf eine Heizmatte gelagert. Sie erhielten zur Unterstützung der Spontanatmung eine kontinuierliche Sauerstoffvorlage über einen Nasenflow von 2 Liter Sauerstoff/ min. Zum Schutz der Cornea wurde Dexpanthenol/ Bepanthen® Roche Augen- und Nasensalbe (Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) lokal appliziert.

Alle drei operativen Eingriffe wurden unter sterilen Kautelen von einem Operateur durchgeführt. Die Dauer des ersten Eingriffs betrug ca. 110-180min, des zweiten Eingriffs ca. 100-150min und des letzten Eingriffs ca. 180-300min.



Abbildung 4: Lagerung des Kaninchens nach steriler Abdeckung.

### 3.6 Operationstechnik und Instrumentarium

#### 3.6.1 Eingriff I

Im Folgenden wird das verwendete chirurgische Instrumentarium beschrieben. Abbildung 5 zeigt die für die Präparation der Knorpelgruppe KL verwendete Metallschablone (Eigenanfertigung), der Abstand der Stanzungen beträgt ca. 2,5mm.

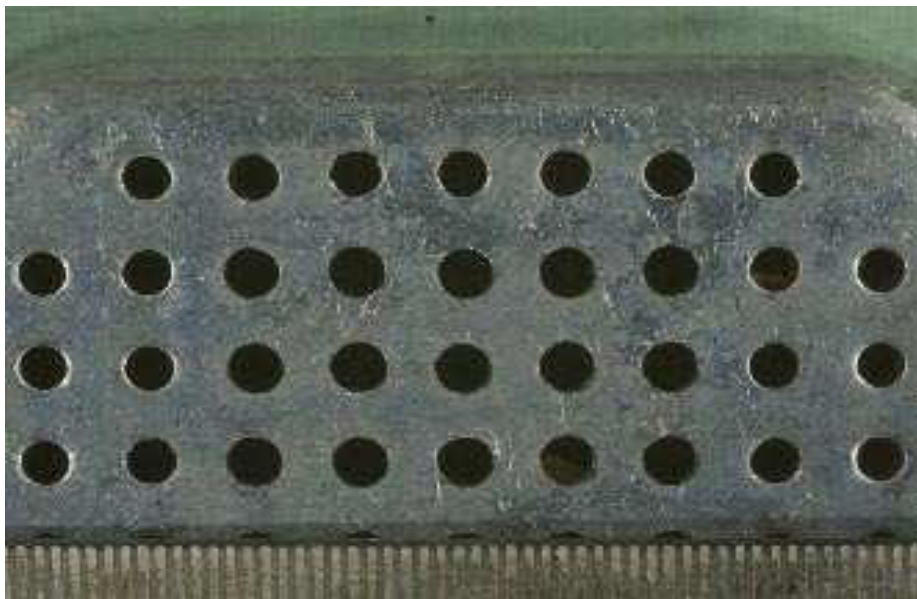


Abbildung 5: Metallschablone zur Herstellung der Stanzgröße KL mit einem Durchmesser von 1,5mm.

Abbildung 6 zeigt den zur Knorpelpräparation für die Knorpelgruppe GL benutzten Biopsie Punch (Stiefel Laboratorium GmbH, Mühlheimer Str. 231, 63075 Offenbach) mit einem Innendurchmesser von 4mm.

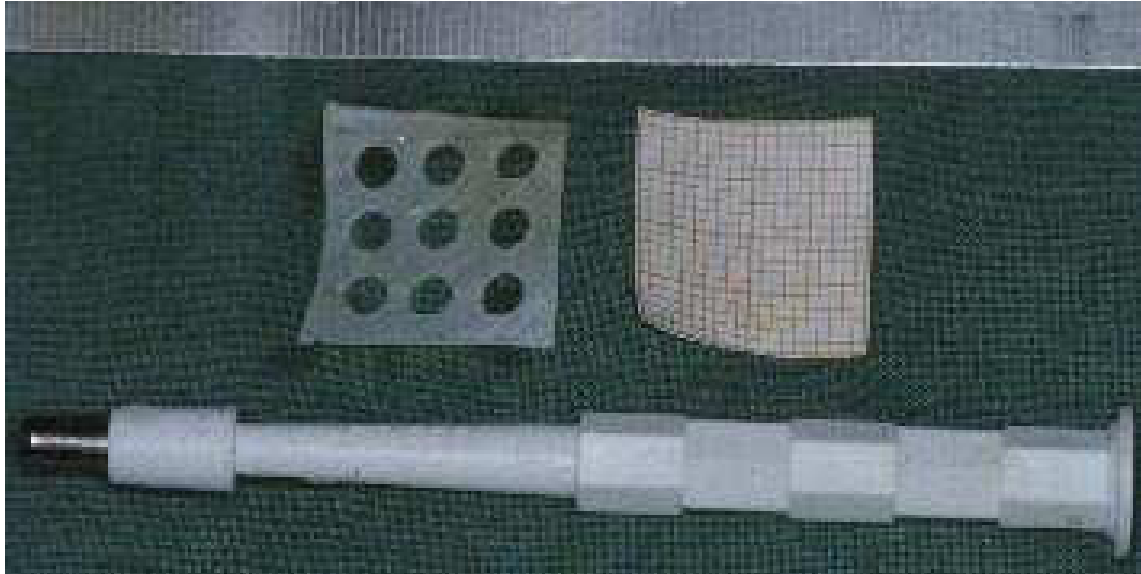


Abbildung 6: Biopsie Punch zur Herstellung der Stanzgröße GL mit einem Durchmesser von 4mm.

Abbildung 7 zeigt das für die drei Eingriffe benutzte chirurgische und mikrochirurgische Instrumenteset.

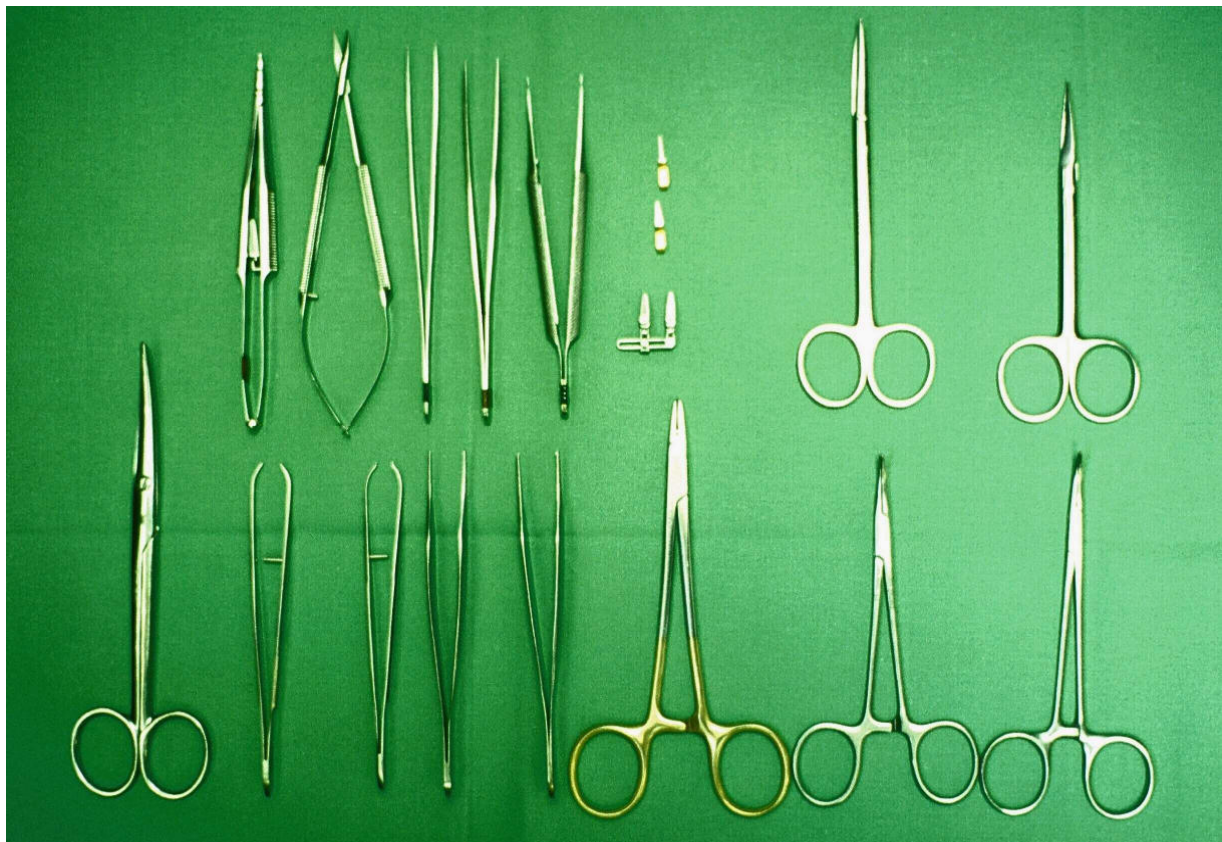


Abbildung 7: Chirurgisches Instrumenteset.



Im Rahmen des ersten operativen Eingriffs wurde freier Ohrknorpel mit Perichondrium entnommen und nach Präparation durch zwei unterschiedliche Stanzungen heterotop gemeinsam mit der Kontrollgruppe auf die A. epigastrica superficialis implantiert.

Im ersten Teil des ersten Eingriffs wurde im mittleren Bereich des Ohrrückens eines Ohres die Haut längs inzidiert. Es erfolgte die Präparation eines ca. 6 x 2cm großen Knorpelstücks, das unter sorgfältiger Darstellung der umliegenden Gefäße unter laufender Blutstillung mittels bipolarer Koagulation (MET F. L. Fischer, Berlin) entnommen wurde.



Abbildung 8: Präparation des Ohrknorpels.

Abschließend wurde die Haut mit 4-0 Ethilon® (Ethicon, Norderstedt) intrakutan fortlaufend vernäht.

Es folgte nun in gleicher Narkose der zweite Teil des ersten Eingriffs.

Dieser bestand aus der unterschiedlichen Knorpelpräparation und der heterotopen Implantation der im Folgenden beschriebenen Knorpelgruppen.

Zur Vorbereitung auf die heterotope Implantation wurde das unter Belassung des Perichondriums entnommene Knorpelstück in drei gleich große, ca. 2 x 2cm messende Quadrate geteilt. Die entstandenen Quadrate wurden nach dem Zufallsprinzip entweder einer der beiden Variablengruppen oder der Kontrollgruppe zugeteilt.

Pro Tier entsprach die Kontrollgruppe einem 2 x 2cm messenden Knorpelquadrat.

Die erste Vergleichsgruppe bestand bei jedem Tier aus einem 2 x 2cm großen, perichondriumhaltigen Knorpelquadrat, in das mit einer im Durchmesser 1,5mm messenden Straußenkanüle® (Dispomed Witt, Gelnhausen - Haller) 4 x 5 entsprechend

große Löcher unter Zuhilfenahme der selbstangefertigten Metallschablone mit einem Abstand von ca. 4mm gestanzt wurden.

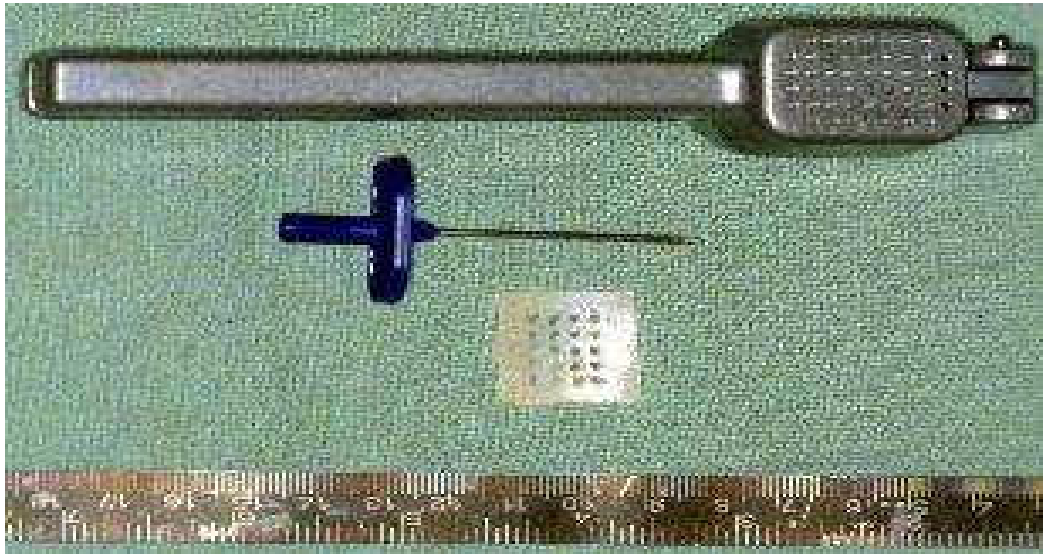


Abbildung 9: Metallschablone, Straußenkanüle®, Knorpelgruppe KL.

Mit einem Biopsie Punch erhielten die Knorpelquadrate der zweiten Gruppe 3 x 3 Stanzungen mit einem Einzeldurchmesser von 4mm in einem Abstand von ca. 3mm unter Zuhilfenahme einer Millimeterschablone (Stauen, Germany).

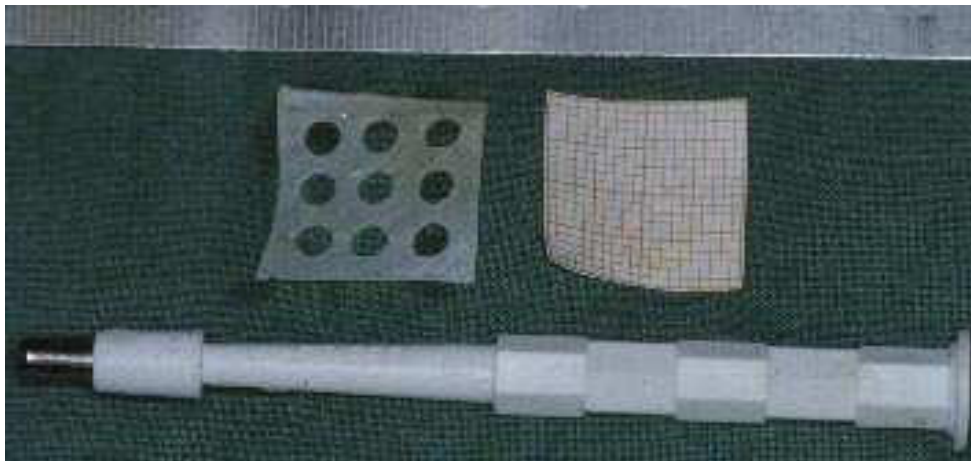


Abbildung 10: Knorpelgruppe GL, Biopsie Punch.

Die Aufarbeitung des Knorpels wurde bei Raumtemperatur unter kontinuierlicher Feuchthaltung des Knorpels und unter sorgfältiger Schonung des Restknorpels durchgeführt.



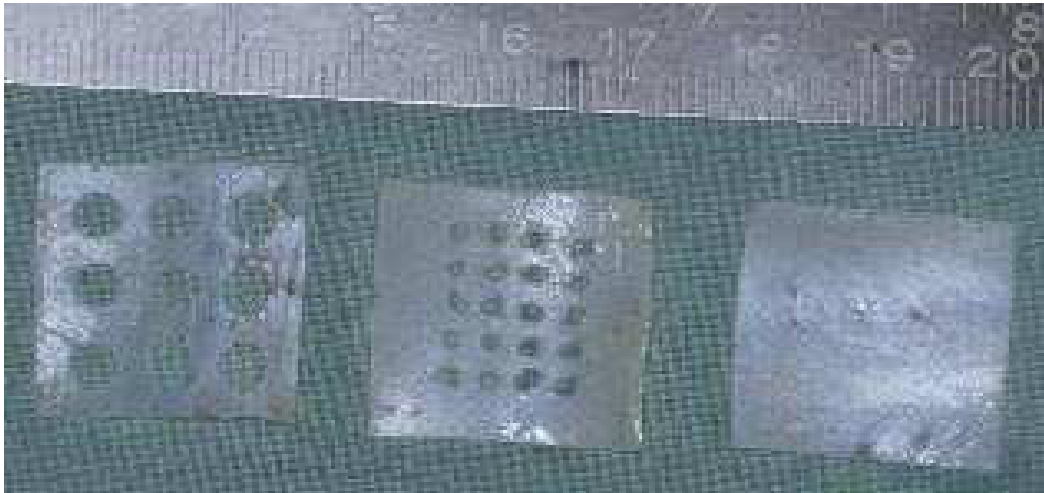


Abbildung 11: 4mm gestanzter Knorpel links (GL), 1,5mm gestanzter Knorpel in der Mitte (KL) und nativer Knorpel rechts (KO).

Im dritten Abschnitt des ersten Eingriffs wurde nach Präparation der Knorpelgruppen die Bauchhaut über einen medianen Längsschnitt von der Symphyse bis zum Xiphoid eröffnet.

Als Implantationsort für den entnommenen Knorpel wurde das Versorgungsgebiet der A. und V. epigastrica superficialis ab ca. 7cm cranial der Symphyse gewählt. Dazu wurde bei allen zehn Tieren die linke A. und V. epigastrica superficialis auf einer Länge von 10cm unter vorsichtiger Blutstillung durch Elektrokoagulation und sorgfältiger Darstellung der Gefäßabgänge präpariert.

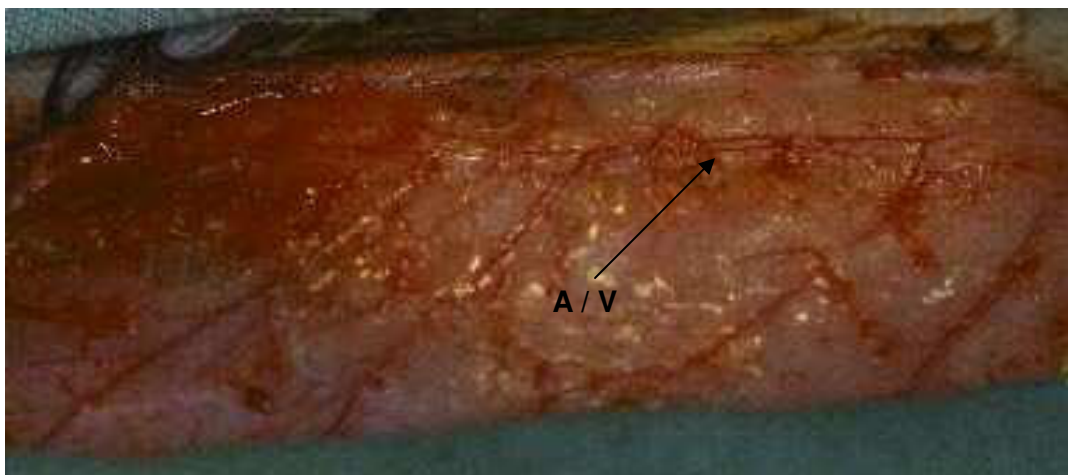


Abbildung 12: A. und V. epigastrica superficialis sinistra (A / V).

### 3 Material und Methodik

---

Bei jedem Kaninchen wurde aus jeder Untersuchungsgruppe jeweils ein Knorpelpräparat mit Einzelknopfnähten (Ethilon® 4-0, Ethicon, Norderstedt) direkt auf der freigelegten A. und V. epigastrica superficialis fixiert. Die Reihenfolge, in der die Knorpelquadrate der einzelnen Gruppen im Gefäßverlauf von kranial nach kaudal implantiert wurden, war randomisiert und deren gegenseitiger Implantationsabstand betrug mindestens 1,5cm.

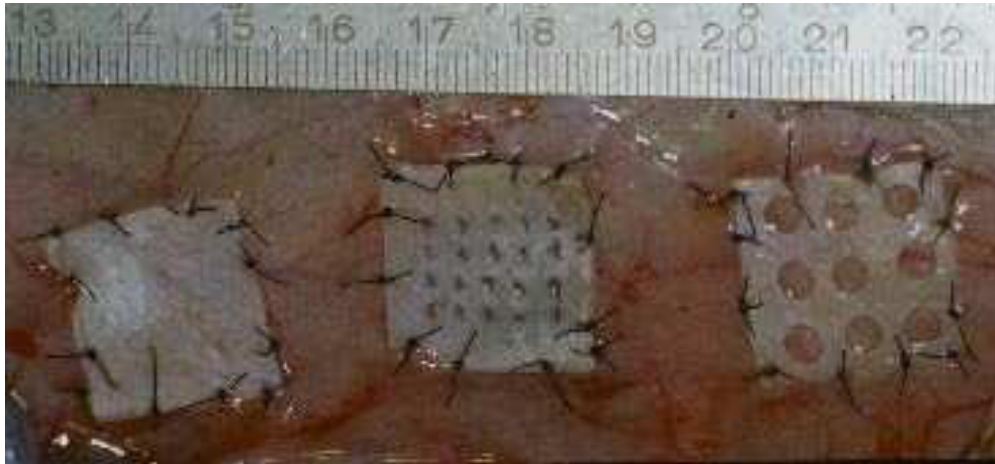


Abbildung 13: Eingriff I nach heterotoper Knorpelimplantation auf die A. und V. epigastrica superficialis.

Die nachfolgende Tabelle beschreibt die Permutation des Implantationsortes der einzelnen Knorpelgruppen mit kleiner Stanzung, großer Stanzung und der nativen Kontrollgruppe in axialer Ausrichtung, dabei entspricht Position 1 der kaudalen, Position 2 der mittleren und Position 3 der kranialen Implantationsstelle bei den 10 Tieren.

Tiernr.	GL	KL	KO
79	1	3	2
80	3	2	1
91	2	1	3
109	1	3	2
110	3	2	1
111	2	1	3
112	1	3	2
133	3	2	1
170	2	1	3
171	1	3	2

Tabelle 5: Position der Knorpelimplantate in situ.

Anschließend erfolgte der Wundverschluss mit Ethilon® 3-0 (Ethicon, Norderstedt) in fortlaufender Intrakutannaht.

#### 3.6.2 Eingriff II

Der zweite Eingriff erfolgte nach einem Beobachtungsintervall von vier Wochen.

Im Rahmen des zweiten Eingriffs wurde Vollhaut von der unversehrten, kontralateralen Abdomenseite entnommen, um sie anschließend auf die bis dahin seit 4 Wochen in situ verbliebenen Knorpelimplantate zu nähen.

Dazu wird eine Vollhautfläche von ca. 2 x 6cm im Bereich der kontralateralen rechten Abdomenseite präpariert und entnommen.

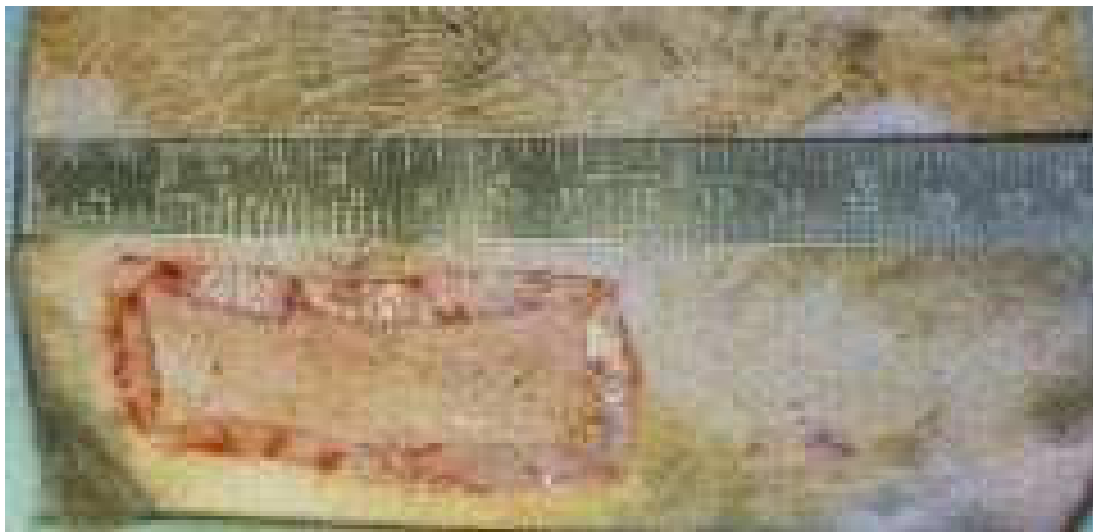


Abbildung 14: Abdominale Vollhautentnahme.

Der kutane, abdominale Hebedefekt wurde in fortlaufender Intrakutannaht mit Ethilon® 3-0 verschlossen.

Die drei Knorpelstücke wurden einzeln unter Belassung der sich bis dahin entwickelten vaskularisierten, bindegewebigen Verschiebeschicht freigelegt. Diese wurde lediglich entlang der Knorpelränder inzidiert, um eine Versorgung dieser Schicht und des nachfolgenden Hauttransplantats ausschließlich durch vertikal eingesprossene Gefäße sicherzustellen und den Einfluss von horizontal eingewachsenen Gefäßen zu reduzieren. Intraoperativ wurde der Knorpel nach vierwöchiger Einheilungsphase vermessen und klinisch in einem Scoreverfahren hinsichtlich Vitalität und Fläche beurteilt. Das Vollhauttransplantat wurde in drei gleich große, 2 x 2cm messende Vollhautquadrate geteilt. Die Bearbeitung der Vollhaut erfolgte bei Raumtemperatur unter sorgfältiger Feuchthaltung und Schonung des Gewebes. Bei jedem Tier wurden die

drei zu transplantierenden Vollhautstücke mit ca. 12 Einzelknopfnähten Ethilon® 4-0 im Niveau der Haut direkt auf die drei freigelegten Knorpelrechtecke genäht.



Abbildung 15: Eingriff II nach Vollhautimplantation.

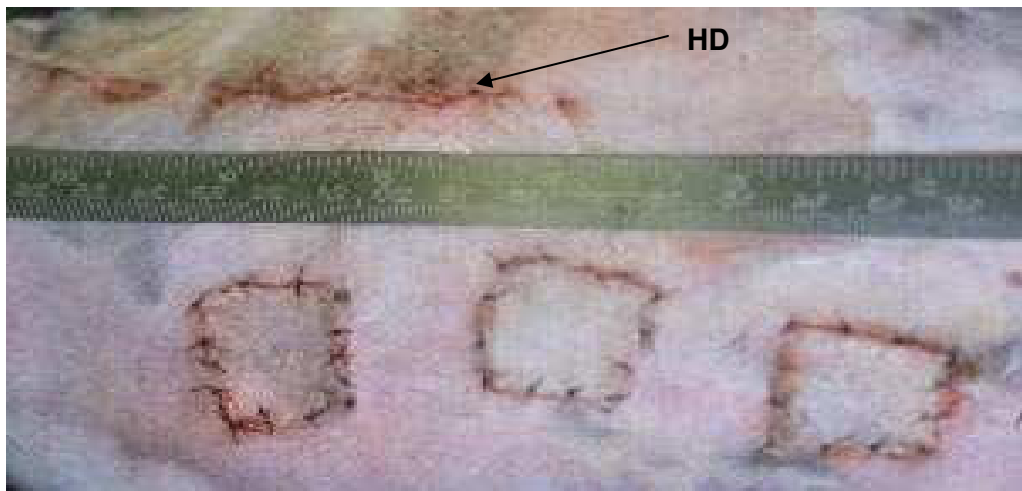


Abbildung 16: Eingriff II nach Vollhautimplantation mit kontralateraler Hebedefektdeckung (HD).

### 3.7 Postoperative Versorgung

Nach Eingriff I und II bestand die Wundversorgung aus einem atmungsaktiven, antiseptischen Nobekutan® Sprühverband (Astra Chemicals GmbH, Wedel) und einem Rudavlies® Pflasterverband (Noba Verbandmittel Danz GmbH, Wetter-Wengern). Zum zusätzlichen Wundschutz wurde allen Tieren ein dauerelastischer, thorakoabdominaler Schlauchverband aus TG - Grip G® (Lohmann, Neuwied) übergezogen.

Nach s.c. Injektion des Antibiotikums Enrofloxacin/ Baytril® 2,5% (Bayer, Leverkusen) 5mg/kg KG und s.c. Injektion des Analgetikums Buprenorphinhydrochlorid/ Temgesic® (Boehringer Mannheim GmbH, Germany) 0,05mg/ kg KG wurden die Tiere während der Aufwachphase in die Transportbox gelegt.

In der Aufwachphase wurde die Sauerstoffabgabe über den Nasenflow und die Wärmezufuhr durch die Heizmatte beibehalten, um einer Hypothermie und Hypoxie in der Aufwachphase vorzubeugen. Nach Erreichen des Stellreflexes wurden sie in ihren Einzelkäfig gesetzt. Futter und Wasser standen ihnen sofort ad libitum zur Verfügung.

Zur postoperativen Nachsorge erhielten die Tiere eine Antibiose mit Enrofloxacin/ Baytril® 2,5% (Bayer, Leverkusen) 5mg/kg KG, s.c. appliziert, einmal täglich über einen Zeitraum von sechs Tagen. Die Analgesie mit Buprenorphinhydrochlorid 0,05mg/ kg KG, s.c. injiziert, wurde in Abhängigkeit der klinischen Symptomatik und des Allgemeinzustands in der Folgezeit bis zu zweimal täglich weitergeführt.

Regelmäßige TG-Grip®-Anzugwechsel waren Bestandteil der postoperativen Behandlung.

Die abdominalen und aurikulären Wunden wurden regelmäßig kontrolliert zum Ausschluss von Wundinfektion und Wundheilungsstörung (Ischämie, Ödem, Entzündung, Nekrose). Ebenso wurde eine Beurteilung des Allgemeinzustandes der Kaninchen regelmäßig durchgeführt. Auf eine postoperative Heparinisierung wurde verzichtet.

### 3.8 Schlusspräparation

Nach einem weiteren Beobachtungsintervall von vier Wochen wurden die Tiere dem letzten Eingriff zugeführt. Hier wurden analoge Operationsvorbereitung und Narkose wie bei Eingriff I und II (siehe Kap. 3.4 und 3.5) durchgeführt. Im Rahmen dieser dritten Operation erfolgte nach insgesamt 8 wöchiger Beobachtungszeit die Kontrastmittelperfusion der prälaminierten chondrokutanen Lappen sowie die Gewebegewinnung zur weiterführenden Auswertung.

Zur Vorbereitung der nachfolgenden Schritte wurde den Tieren 2 h vor Operationsbeginn 5.000 I.E. Heparin (Heparin-Natrium 25000 IE Ratiopharm®, Ratiopharm GmbH, Ulm) subkutan injiziert.

Die Schlusspräparation wurde unter mikroskopischer Kontrolle mit einem mikrochirurgischen Instrumentenset durchgeführt. Intraoperativ erfolgte die klinische Beurteilung der Vollhautimplantate nach vierwöchiger Einheilungsphase. Zunächst wurde der chondrokutane Lappen sowie ein vergleichbar großer nativer Hautlappen auf der kontralateralen Seite als angiographische Kontrolle präpariert.

Für die anschließende Kontrastmittelperfusion des chondrokutanen Lappens und des nativen Hautlappens wurde die A. femoralis communis beidseits zur arteriellen Katheterisierung gewählt. Dazu wurden die Aa. epigastricae superficiales sowie die Aa. femorales communes beidseits ausgehend vom Ligamentum inguinale auf einer Länge von 4cm nach kaudal freigelegt. Die Aa. femorales communes wurden jeweils mit einer Biemer-Klemme ca. 1cm proximal und mit Biemer-Klemmen ca. 2cm distal des Abgangs der Aa. epigastricae superficiales unterbunden. Zwischen den beiden distal angebrachten Klemmen wurden die Aa. femorales durchtrennt und eine 26G Vasculon Plus® Kanüle (Ohmeda, Helsingborg, Schweden) jeweils bis kurz vor den Abgang der Aa. epigastricae superficiales eingeführt. Die Fixation der Kanülen erfolgte mit 6-0 Prolene® (Ethicon, Norderstedt).

Über ein Infusionssystem (R87V Ohmeda, Erlangen) wurden unter gleichmäßigem Perfusionsdruck von 100 cmH<sub>2</sub>O selektiv die Aa. femorales communes retrograd und die Aa. epigastricae superficiales orthograd perfundiert. Hierfür wurden die Aa. femorales proximal des Abganges der Aa. epigastricae superficiales legiert.



Abbildung 17: Katheterisierung der A. femoralis communis (AF).

Die arterielle Perfusion des chondrokutanen Lappens sowie des nativen Hautlappens wurde mit Ringer Lösung für jeweils 30min eingeleitet. Anschließend wurde für weitere 45min eine Suspension aus gefiltertem Bariumsulfat/ Micropaque® (Guerbet GmbH, Sulzbach) und ein Plasmaexpander Rheomacrodex 10 %® (Fa. Pharma Reusch GmbH, Bonn) im Verhältnis 2 : 1 verdünnt, infundiert. Dieser Suspension wurden 10.000I.E. Heparin/ 500ml (Heparin-Natrium 25000IE, Ratiopharm GmbH, Ulm) zugesetzt.



Abbildung 18: Perfusion mit Ringer Lösung, kontralateral bereits mit Bariumsulfat, schwarze Punkte markieren die Ecken der eingehheilten Vollhaut.



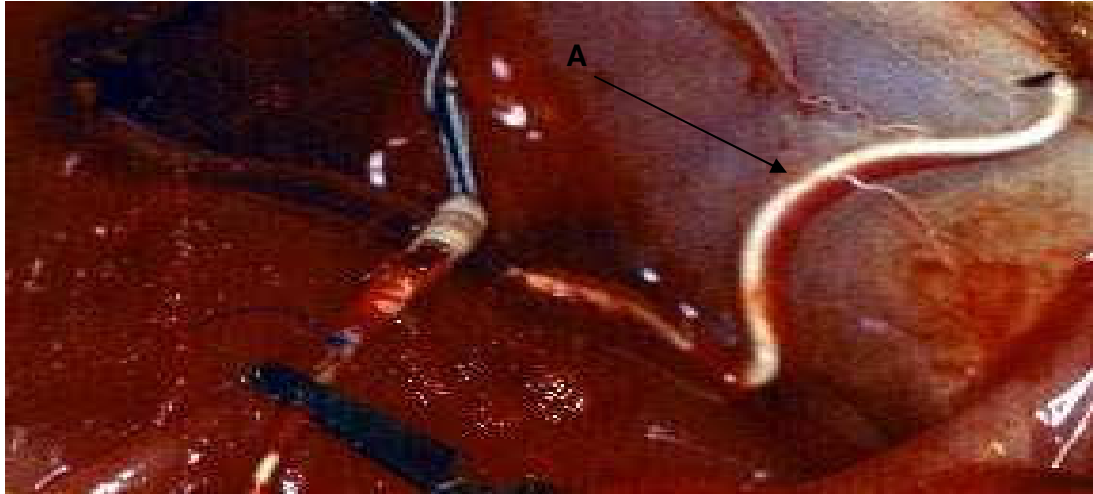


Abbildung 19: Regelrechte Bariumsulfatperfusion der A. epigastrica superficialis (A).

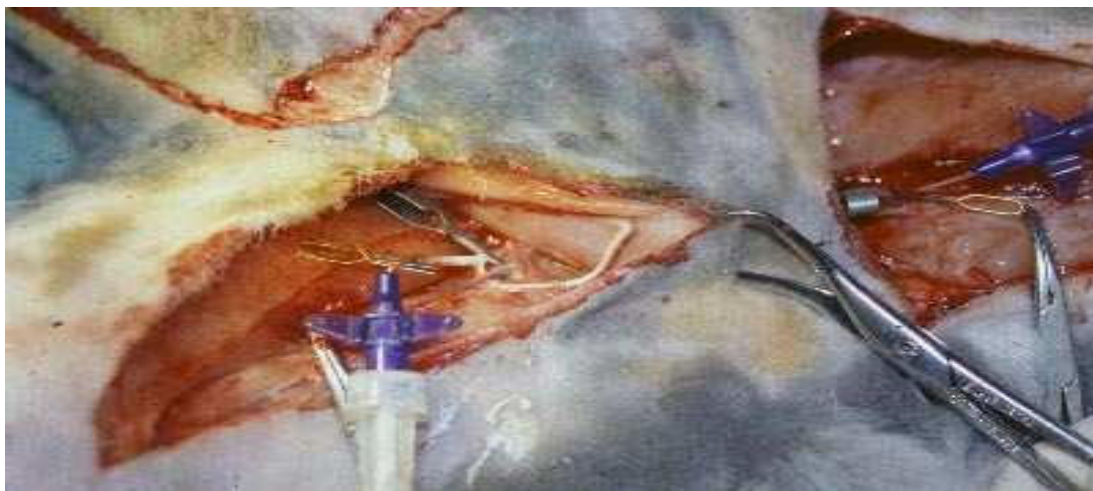


Abbildung 20: Bariumperfusion der A. epigastrica superficialis beidseits.

Während der letzten 15min der Kontrastmittelperfusion wurden die Vv. epigastricae superficiales des prälaminierten Lappens und des kontralateralen Hautlappens sowie die Aa. epigastricae superficiales legiert, um einem Abfluten des Kontrastmittels aus dem chondrokutanen Lappen und dem kontralateralen Hautlappen vorzubeugen und somit eine ausreichende Kontrastmittelfüllung der Gefäße zu erreichen. Zur Entnahme des perfundierten Lappens wurden die Kontrastmittelzuführenden Aa. epigastricae superficiales kurz nach dem Abgang aus den Aa. femorales ligiert. Der gesamte mit Kontrastmittel perfundierte prälaminierte Lappen

wurde mit einem Seitenabstand von 2cm zum Knorpel präpariert und die Ränder sorgfältig

elektrokoaguliert, um einer seitlichen Leckage des Bariumsulfatgemisches und somit einem Kontrastmittelverlust über seitliche Gefäßäste vorzubeugen. Insgesamt wurde eine Menge von 8-10ml Bariumsulfat zur Kontrastmittelperfusion je Seite verwendet. Der prälaminierte Lappen und der ebenso präparierte kontralaterale, native Hautlappen wurden entnommen und der weiterführenden Auswertung zugeführt.



Abbildung 21: Präparation des prälaminierten, chondrokutanen Lappens nach Bariumsulfatperfusion.

Unmittelbar nach der Entnahme des zu untersuchenden chondrokutanen Lappens und des kontralateralen Hautlappens wurden die narkotisierten Kaninchen mit Pentobarbital/ Narcoren® 160mg/kg Kg i.v. schmerzlos getötet.

### 3.9 Untersuchungsabschnitt

#### 3.9.1 Klinisch-makroskopische Beurteilung

Im Verlauf des zweiten und dritten operativen Eingriffs erfolgte eine klinisch-makroskopische Beurteilung der Knorpeltransplantate, der Vollhauttransplantate und der Wundheilung im Bereich der Spenderareale. Hierbei konnte die Gewebektivität und -integrität sowie das Vorliegen von Entzündungszeichen grob beurteilt werden. Jede Operation wurde anhand der folgenden Protokolle dokumentiert:

##### 3.9.1.1 Eingriff I

Datum	
Tiernr.	
Versuchsnr.	
Gewicht	
Op –Dauer	
Narkosedauer	
Komplikation	

	Seite/Reihenfolge (re./li., kaudal/ Mitte/ kranial)	Knorpeldicke	Knorpelfläche	Sonstiges
1. Kontrolle				
2. KL				
3. GL				

##### Postoperative Phase

	Medikation	Wunde/Ohr	Wunde/Abdomen	Sonstiges
1.postop.Tag				
2.postop.Tag				
3.postop.Tag				
4.postop.Tag				
5.postop.Tag				
1.postop. Wo.				
2.postop.Wo.				
3.postop.Wo.				

### 3.9.1.2 Eingriff II

Datum	
Tiernr.	
Versuchsnr.	
Gewicht	
Ohrstatus	
Op –Dauer	
Narkosedauer	
Komplikation	

	Bauchwunde	Knorpelfläche	Knorpelscore			Vollhaut	Sonstige
1.Kontrolle							
2. KL							
3. GL							
Makroskopische Übereinstimmung zu Ursprungsgewebe		komplett teilweise keine				2 1 0	
Erosionen		keine teilweise komplett				2 1 0	
Fläche		Ausgangsfläche <100% der Ausgangsfläche <75% der Ausgangsfläche				2 1 0	

#### Postoperative Phase

	Medikation	Wunde/Ohr	Wunde/Abdomen	Sonstiges
1.postop.Tag				
2.postop.Tag				
3.postop.Tag				
4.postop.Tag				
5.postop.Tag				
1.postop. Wo.				
2.postop. Wo.				
3.postop. Wo.				

### 3.9.1.3 Schlusspräparation

Datum	
Tiernr.	
Versuchsnr.	
Gewicht	
Ohrstatus	
Sonstiges	
Op -Dauer	
Narkosedauer	

	Seite/Reihenfolge	Bauchwunde	Hautfläche	Hautscore			Sonstiges
1. Kontrolle							
2. KL							
3. GL							
Makroskopische Übereinstimmung zu Ursprungsgewebe		komplett		2			
		teilweise		1			
		keine		0			
Erosionen		keine		2			
		teilweise		1			
		komplett		0			
Fläche		Ausgangsfläche		2			
		<100% der Ausgangsfläche		1			
		<75 % der Ausgangsfläche		0			

#### 3.9.2 Angiographie

Der gesamte entnommene prälaminierte Lappen sowie der Kontrollhautlappen wurden nach Bariumsulfatperfusion in situ jeweils auf die ursprüngliche Fläche aufgespannt und auf eine röntgendurchlässige Korkplatte fixiert. Mit einem Röntgengerät Typ Torr Radiofluor 120® (Fa. Philipps Electronic Instruments, München) wurden Aufnahmen auf einem X. OMAT® (Ready-Pack®, Fa. Kodak, Frankreich) Röntgenfilm angefertigt. Von dem Knorpel-Vollhautlappen und dem Kontrollhautlappen wurden jeweils zwei Aufnahmen mit 19 kV und 20 kV bei 5 mA und einer Belichtungszeit von je 30 sec in einer Ebene angefertigt.

Zur Betrachtung und Auswertung wurden die Bilder auf übliche Röntgenbildbetrachter gelegt.

Die Abbildung 22 stellt zwei ausgewählte Beispiele der angefertigten Angiographien dar.

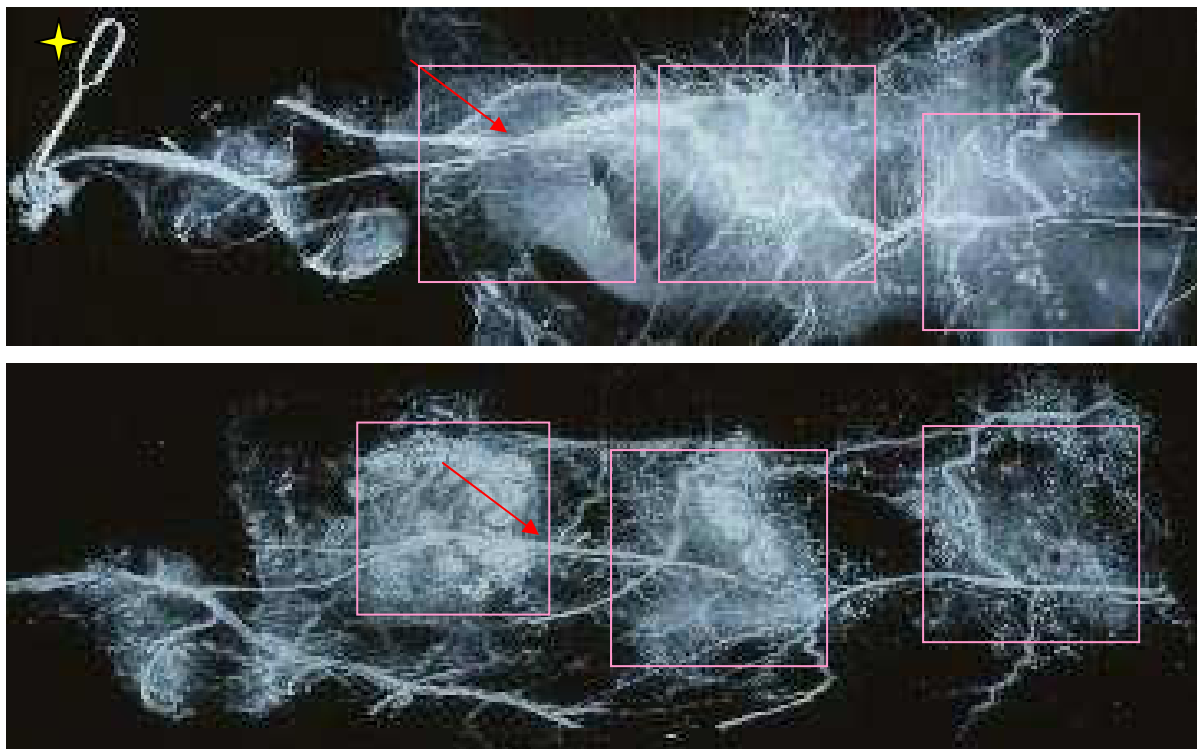


Abbildung 22: ausgewählte Angiographien der chondrokutanen Lappen (rosa Rechtecke) zum Zeitpunkt der Schlusspräparation mit Darstellung der A. und V. epigastrica superficialis (roter Pfeil), Klemme nach Biemer (gelber Stern).

#### 3.9.2.1 Quantitative Auswertung

Um eine möglichst objektive und exakte Evaluation der Vaskularisation im Bereich des chondrokutanen Lappens und des nativen Kontrollhautlappens zu erzielen, wurden die angiographischen Aufnahmen nach folgendem Schema beurteilt und quantifiziert. Die Auswertung erfolgte unter Berücksichtigung der Lokalisation und der Reihenfolge der Knorpelimplantate bzw. der kontralateralen Hautareale.

Eine Messschablone wurde 90° zum axialen Verlauf der A. epigastrica superficialis und senkrecht auf die Knorpel- Vollhautlappen gelegt. Die Messung im kontralateralen Hautlappen wurde analog an äquivalenten Hautarealen durchgeführt.

Die Messschablone wies vier parallele Linien auf, die zueinander einen Abstand von 5mm haben. Die Projektion der Linien auf das Knorpel- Vollhautareal erfolgte mit einem Abstand von 2,5mm zum Rand. Diese Linien werden im Folgenden als virtuelle Schnittlinien mit den angiographisch dargestellten Kapillargefäßen zur weiteren Auswertung genutzt. Die Schnittlinie 1 entspricht dabei der am weitesten kaudal, Schnittlinie 4 der am weitesten kranial auf dem jeweiligen Knorpel bzw. Hautquadrat gelegenen Linie.

Im Folgenden ist die Auswertungsschablone schematisch dargestellt.

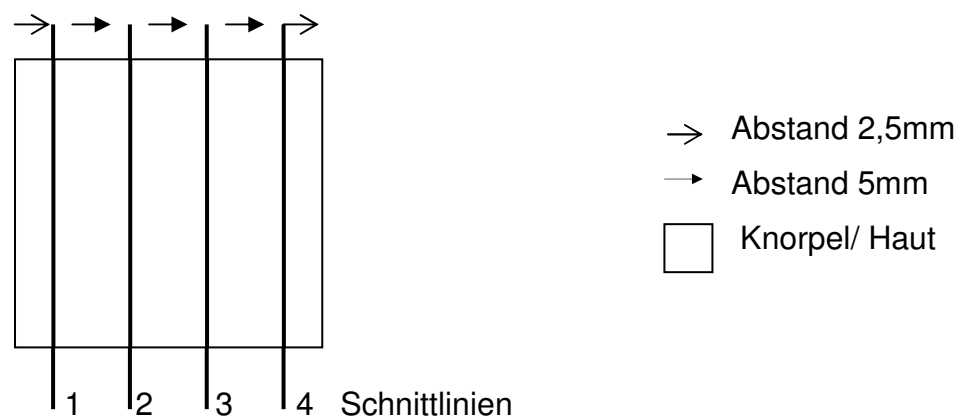


Abbildung 23: Auswertungsschablone für Angiographie.

Die Anzahl der mit bloßem Auge erkennbaren, Kontrastmittel-gefüllten Gefäße, die mit den jeweils vier einzelnen Schnittlinien Schnittpunkte bilden, wurde erfasst. Die Messung wurde jeweils dreimal durchgeführt und das arithmetische Mittel der Schnittpunkte je Schnittlinie im Messareal bestimmt. Diese Summation erfolgt pro

Tier für beide Knorpelvarianten, die Kontrollgruppe und die Äquivalentareale im kontralateralen Hautlappen. Mit diesem Rasterverfahren konnten wir reproduzierbare Messungen durchführen.

Das arithmetische Mittel der Gefäßschnittpunkte im Bereich des nativen, kontralateralen Hautlappens wurde als Kontrolle und Referenz für die Gefäßverteilung (entsprechend 100%) festgelegt. Die arithmetischen Mittel der Gefäßschnittpunkte im Bereich der beiden Knorpelvarianten und der Kontrollgruppe wurden dazu ins Verhältnis gesetzt und die Abweichung wurde als prozentuale Neovaskularisation bzw. Rarefizierung von Gefäßen interpretiert.



#### 3.9.2.2 Qualitative Auswertung

Im Rahmen der qualitativen Beurteilung wurde makroskopisch zwischen arteriellen und venösen Gefäßen unterschieden soweit diese Differenzierung bei der Auswertung der angiographischen Darstellungen mit bloßem Auge möglich war.

Zusätzlich wurden die arteriellen und venösen Gefäßkaliber nach folgendem Score beurteilt und gingen ebenfalls in die qualitative angiographische Auswertung mit ein:

- A Arteria epigastrica superficialis / Vena epigastrica superficialis
- B Abgang 1. Grades der Arteria epigastrica superficialis/ Vena epigastrica superficialis
- C Abgang 2. Grades der Arteria epigastrica superficialis/ Vena epigastrica superficialis

Für die qualitative Auswertung wurde das in Kapitel 3.9.2.1 beschriebene Verfahren der Schnittpunkte und Schnittlinien angewandt.

Die Anzahl der arteriellen und venösen Gefäße, die mit den Schnittlinien Schnittpunkte bildeten, wurden ausgezählt. Gleichzeitig wurde der Größendurchmesser der dargestellten Gefäße mitabgebildet. Dabei wurde die A. epigastrica superficialis bzw. V. epigastrica superficialis als Referenzgefäße mit A bezeichnet. Abgehende Gefäße ersten Grades wurden als Gefäße der Klasse B klassifiziert. Die Größenordnung C, entsprechend den abgehenden Gefäßen zweiten Grades, repräsentierte die kleinsten gerade noch mit bloßem Auge sichtbaren Gefäße. Durch dreimalige Messung wurden diese Ergebnisse überprüft und das arithmetische Mittel bestimmt.

Diese Vorgehensweise der qualitativen Auswertung der Angiographie wurde an jedem Tier für beide Knorpelgruppen, die Kontrollgruppe und die Äquivalenzflächen im kontralateralen Hautlappen, jeweils für das arterielle und für das venöse Gefäßsystem getrennt durchgeführt.

Exemplarisch wird für die Knorpelvarianten GL und KL, für die Kontrollgruppe KO und das äquivalente Hautareal ngl, bzw. nkl, bzw. nko nachfolgend jeweils nur die tabellarische Darstellung des arteriellen Gefäßsystems gezeigt, die venöse Darstellung erfolgte analog.

### 3 Material und Methodik

---

	GL_1	GL_2	GL_3	GL_4	ngl_1.	ngl_2.	ngl_3.	ngl_4.	A	B	C
	.SL	.SL	.SL	.SL	SL	SL	SL	SL			
79											
80											
91											
109											
110											
111											
112											
133											
170											
171											

Tabelle 6: Qualitative Auswertung der Angiographie: arterielles Gefäßsystem GL, ngl.

	KL_1	KL_2	KL_3	KL_4	nkl_1.	nkl_2.	nkl_3.	nkl_4.	A	B	C
	SL	SL	SL	SL	SL	SL	SL	SL			
79											
80											
91											
109											
110											
111											
112											
133											
170											
171											

Tabelle 7: Qualitative Auswertung der Angiographie: arterielles Gefäßsystem KL, nkl.

### 3 Material und Methodik

---

	KO_1	KO_2	KO3	KO_4	nko_1.	nko_2.	nko_3.	nko_4.	A	B	C
	SL	SL	SL	SL	SL	SL	SL	SL			
79											
80											
91											
109											
110											
111											
112											
133											
170											
171											

Tabelle 8: Qualitative Auswertung der Angiographie: arterielles Gefäßsystem KO, nko.

### 3.9.3 Planimetrie

Zum Zeitpunkt der Vollhautimplantation während des zweiten operativen Eingriffs wurden die drei Vollhauttransplantate nach erfolgreicher Implantation mit einer Nikon® F601 Kamera mit Nikon® Ringblitz auf Ektachrome 64® Film photographiert. Nach der vierwöchigen Einheilungsphase wurde der entnommene prälaminierte, chondrokutane Lappen mit einer Stativkamera Reprovit II® (Leitz) in Aufsicht mit einem Medical Nikkor® 120 mm Objektiv und mit einsehbarer Skalierung in mm photographiert.

Anschließend wurden die angefertigten Diapositive der zu untersuchenden Hautareale der chondrokutanen Lappen an einem Diascanner Nikon LS 2000® im Diaformat eingescannt, um sie anschließend an einem Power Macintosh 7600/ 132M® PC mit der Software von Nikoncoolscan® Version 1.05 und Adobe Photoshop® Version 2.5® zu bearbeiten.

Um die Fläche der vitalen Vollhauttransplantate, sowohl zum Zeitpunkt der Implantation, als auch zum Entnahmezeitpunkt zu vermessen, wurden die digitalen Daten mit der Software von NIA Image® 1,59 bearbeitet. Die Größenkalibrierung der Messdaten erfolgte an der regelmäßig neben den Hautgrafts mitabgebildeten Skalierung in mm.

Die Kontrastierung, Farbe und Auflösung der Abbildungen wurden digital optimiert. Anschließend wurde die Fläche der makroskopisch vitalen Vollhauttransplantate umrandet und berechnet. Zur Optimierung der Messgenauigkeit wurde die Messung der drei zu untersuchenden Gruppen jeweils dreimal wiederholt und das arithmetische Mittel bestimmt.

Das Vorgehen bei der Auswertung der planimetrisch ermittelten Befunde war dem der angiographisch ermittelten Befunde analog. Auch hier berechneten wir die prozentuale Abweichung der vitalen Hautfläche nach vierwöchiger Beobachtungsphase bezogen auf die ursprüngliche Hautfläche bei Implantation.



Abbildung 24: Vollhaut bei Implantation.



Abbildung 25: Vollhaut nach 4 wöchiger Einheilungsphase (die schwarzen Punkten kennzeichnen die Ecken des eingeeilten Vollhautgewebes).

	Fläche der Haut Operation II						Fläche der Haut Operation III					
	KO qcm		KL qcm		GL qcm		KO qcm		KL qcm		GL qcm	
79												
80												
91												
109												
110												
111												
112												
133												
170												
171												

Tabelle 9: Darstellung der planimetrischen Ergebnisse bei Implantation und Explantation.

	KO_1m	KL_1m	GL_1m	KO_2m	KL_2m	GL_2m
79						
80						
91						
109						
110						
111						
112						
133						
170						
171						

Tabelle 10: Arithmetische Mittelwerte (m) der planimetrischen Messung bei Implantation (1) und bei Explantation (2) der Kontrollgruppe KO, KL und GL.

#### 3.9.4 Histologie

Der gesamte prälaminierte Lappen wurde einer lichtmikroskopischen, histopathologischen Untersuchung zugeführt und dazu sorgfältig in die drei zu untersuchenden chondrokutanen Lappen GL, KL und Kontrolle KO unterteilt. Diese wurden in neutralisierter, 6% Formaldehydlösung jeweils ca. 30 Tage fixiert. In aufsteigenden Acetonreihen wurden die Gewebeproben dehydriert und anschließend in Paraffin eingebettet und am Microtom-Kryostat® HM 500 OM (Microm Laborgeräte GmbH, Walldorf) geschnitten. Die Schnittstufen wurden mit einer Schnittdicke von ca. 5  $\mu\text{m}$  und einem Schnittabstand von ca. 30  $\mu\text{m}$  - 50  $\mu\text{m}$  angefertigt. Im folgenden Schema sind die Schnittebenen durch den chondrokutanen Lappen dargestellt.

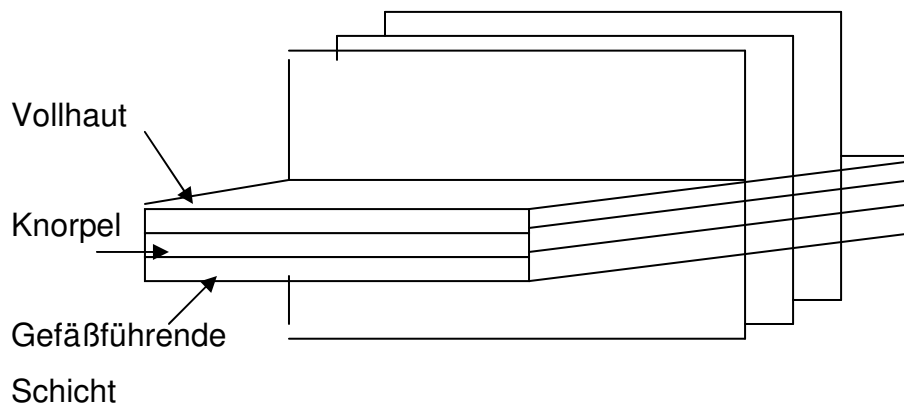


Abbildung 26: Schnittebenen der histologischen Präparate.

Im Bereich der gestanzten Gewebeareale wurden mindestens 5-10 histologische Schnitte angefertigt, siehe Abbildung 27.

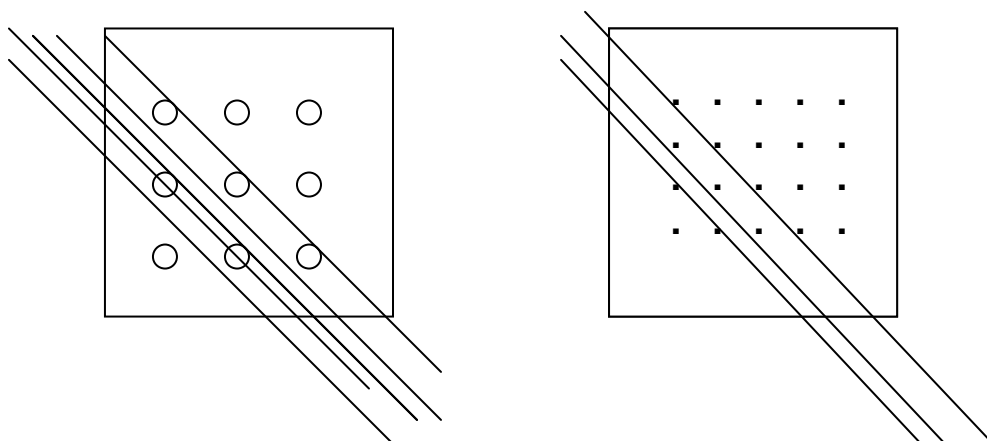


Abbildung 27: Schnittführung im gestanzten Areal.

### 3 Material und Methodik

---

Die Schnitte wurden anschließend jeweils mit Hämatoxylin-Eosin nach Romeis [117] und Elastika van Gieson Färbung untersucht. An einem Durchlichtmikroskop Leica (Fa. Leica, Bensheim) wurden die Gewebeschnitte mit 2,5, 5, 10, 20 und 30 facher Vergrößerung beurteilt. Jede Schnittebene wurde in ihrer vollen Größe untersucht und ausgewertet.

Die Kollagenfasern und die elastischen Fasern wurden durch die H.E. und Elastika van Gieson Färbung suffizient rot bis blassrot dargestellt.

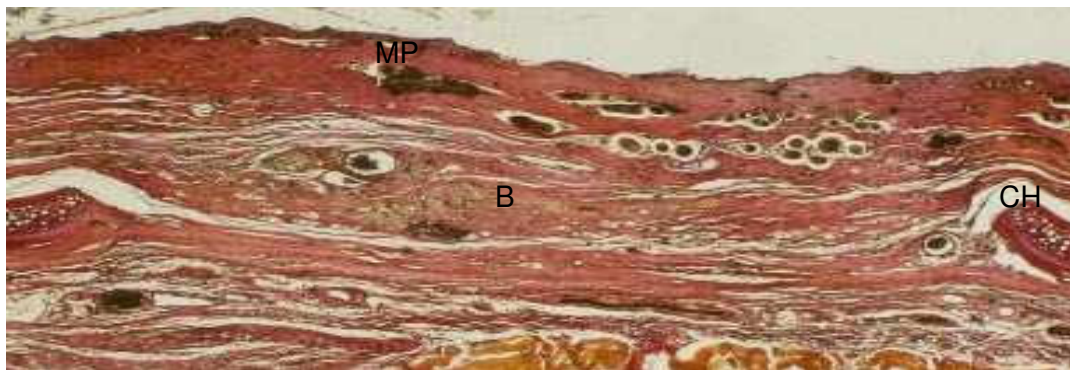


Abbildung 28: Histologie GL, 2,5fache Vergrößerung, Micropaque<sup>®</sup> gefüllte Gefäße (MP), in den Perforationsdefekt eingesprosses Bindegewebe (B), Chondrozyten (CH).



Abbildung 29: Histologie GL, 5fache Vergrößerung, Mikropaque<sup>®</sup> gefüllte Gefäße (MP), in den Perforationsdefekt eingesprosses Bindegewebe (B), Chondrozyten (CH).



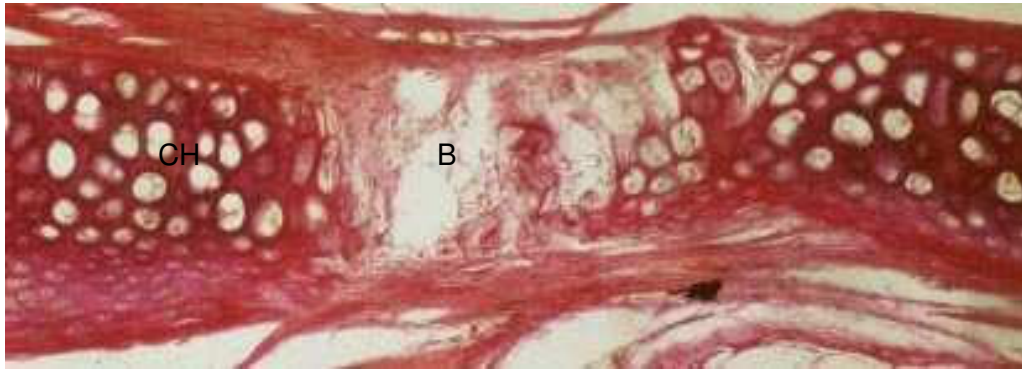


Abbildung 30: Histologie KL, 10fache Vergrößerung, in den Perforationsdefekt eingesprosses Bindegewebe (B), Chondrozyten (CH).



Abbildung 31: Histologie KO, 20fache Vergrößerung, Chondrozyten (CH).

Die Gewebeschnitte wurden nach den folgenden Kriterien beurteilt:

- Morphologie des Knorpels
- Morphologie der Haut und des Unterhautgewebes
- Morphologie und Anzahl der Gefäße in der Verschiebeschicht um den Knorpel und im Stanzbereich.

Mit einem Scoreverfahren wurden die oben aufgeführten histologischen Parameter in drei Abstufungen unterteilt. Hierbei stellt innerhalb aller aufgeführten Parameter die Ausprägung „+“ den am ehesten physiologischen Verhältnissen entsprechenden Zustand dar. „+++“ beschreibt Zustände, die als Folgeerscheinung von Anämie und konsekutivem Gewebeuntergang zu werten sind. Die Ausprägung „++“ bezeichnet Zustände, die zwischen den beiden vorgenannten Extremausprägungen angesiedelt sind. Innerhalb des Scoreverfahrens sind die Ausprägung der Merkmale der zu untersuchenden histologischen Parameter folgendermaßen festgelegt:

### 3 Material und Methodik

Knorpelzustand	- Nekrosen, stark eosinophiles Zytoplasma fahler bis fehlender Nukleus - reife Chondrocyten - Chondrogenese, junge Chondrozyten	+++ ++ +
Perichondriumzustand	- fehlend - verändert - vital	+++ ++ +
Vaskularisierungsgrad des gestanzten Knorpelareals	- gering - mittel - hoch	+++ ++ +

Tabelle 11: Scoreverfahren und Parameter zur histologischen Auswertung der Knorpelvitalität.

Für die histomorphologische Beurteilung der transplantierten Hautareale gelten beim Scoreverfahren die bereits aufgeführten Bewertungskriterien.

Hautoberfläche	- stark beeinträchtigt - abgeflacht - vital	+++ ++ +
Subkutis Schichtung des Bindegewebes	- verdichtet - geringgradig verdichtet - intakt	+++ ++ +
Haarfollikel	- fehlen - unregelmäßig gepackt - regelmäßig gepackt	+++ ++ +
Drüsen	- fehlen - rarefiziert - vorhanden	+++ ++ +
Dermale Gefäße	- vorhanden/ hyperämisch - selten	+++ ++

### 3 Material und Methodik

---

- nicht vorhanden	+
-------------------	---

Tabelle 12: Scoreverfahren und Parameter zur histologischen Auswertung der Hautvitalität.

Die Beurteilung der betrachteten histologischen Parameter und deren Zuordnung zu einer bestimmten Scorestufe erfolgte nach dem Gesamteindruck des Betrachters und dem Auftreten von typischen Zellen und histologischen Phänomenen.

### 3.9.5 Immunhistologie

Das angewandte immunhistologische Auswertungsverfahren wurde als Ergänzung zu den bereits beschriebenen Untersuchungsmethoden durchgeführt. An zusätzlichen histologischen Schnitten von zwei Tieren wurden immunhistochemische Präparate angefertigt. Der Vorteil dieser Untersuchungstechnik besteht darin, mit monoklonalen Antikörpern selektiv neoendothelialisiertes Gewebe darzustellen. Zur immunhistologischen Charakterisierung der Neovaskularisation, insbesondere des Endothels der eingesprossenen Gefäße in die Knorpel - Vollhautlappen wurden die untersuchten Endothelantigene mit der im Folgenden beschriebenen APAAP- Methode (Alkalische Phosphatase anti- Alkalische Phosphatase Komplex) nachgewiesen.

Antikörper (monoklonal)	Epitop	Verdünnung	Referenz/Firma
EC1	Anti Rabbit Endothel/ Podozyten IgG (Primärantikörper)	1:1	Dr. S. Kloth Regensburg
APAAP - Brücke	Anti Maus IgG (Sekundärantikörper)	1:25	DAKO, Hamburg No. Z259
APAAP- Komplex	Maus-anti-alkalische Phosphatase- Antikörper, konjugiert mit intestinaler alkali- scher Phosphatase vom Kalb	1:50	DAKO, Hamburg No. D651

Tabelle 13: Endotheliale Antikörper.

### 3.9.5.1 Lösungen für die APAAP- Färbemethode

#### 1. TBS - Puffer ( Tris - gepufferte physiologische Kochsalzlösung)

0,05M Tris - HCl, 0,15M NaCl, pH 7,6

Bestandteile für einen Liter dieser Lösung:

6,05g Tris - Hydroxymethyl - Aminomethan

9g NaCl

pH 7,6 mit 6M HCl eingestellt.

#### 2. Tris - Puffer 0,05M, pH 9,7

6,057 g Tris/ 1l Aqua dest.

PH 9,7 mit 2M HCl eingestellt.

#### 3. Propandiol 0,2M

21,028 g 2 - Amino - 2 - Methyl - 1,3 - Propandiol/ 1l Aqua dest.

#### 4. Neufuchsinlösung (5%)

0,5 g Neufuchsin in 10 ml 2M HCl

#### 5. Färbecocktail (Substratlösung)

##### Lösung A

25 ml Propandiol (0,2M)

40 mg Levamisole

75 ml Tris - Puffer (pH 9,7)

##### Lösung B

30 mg Naphtol - AS - BI - Phosphat

600 µl N,N - Dimethylformamid

##### Lösung C

20 mg NaNO<sub>2</sub>

500 µl Aqua dest.

200 µl Neufuchsinlösung (Chlorgas - Entwicklung!)

### 3 Material und Methodik

---

Zur Mischung des Färbecocktails wurden zuerst Lösung A und Lösung B gemischt, anschließend wurde Lösung C zugegeben. Das Gemisch wurde mit 2M HCl auf pH 8,7 eingestellt.

#### 3.9.5.2 APAAP - Methode

Es wurden an einem Mikrotom Kryostat, in einem Temperaturbereich von - 21 °C bis - 25 °C, 6µm dicke Gefrierschnitte hergestellt, auf Silan beschichtete Glasobjektträger aufgezogen und bei - 20 °C gelagert. Die im Folgenden beschriebene Methode orientiert sich im Wesentlichen am Standardprotokoll von Cordell et al. 1984 [25]. Die Detektion spezifisch gebundenen Primärantikörpers am Gefrierschnitt beruht dabei auf der Bindung des APAAP- Komplexes (Maus - anti - alkalische - Phosphatase - Antikörper, konjugiert mit alkalischer Phosphatase vom Kalb) an den Brückenantikörper (Kaninchen - anti Maus IgG) der gegen die Spezies des Primärantikörpers (Maus – anti Kaninchen Antikörper) gerichtet ist. Die Farbentwicklung erfolgt durch die Reaktion der alkalischen Phosphatase mit dem im Färbecocktail enthaltenen Substrat Naphtol - AS - BI - Phosphat und dem Chromogen Neufuchsin.

Die Gefrierschnitte wurden zunächst langsam unter Alufolie aufgetaut, luftgetrocknet, 10min lang in Aceton fixiert, wiederum für etwa 10min bei Raumtemperatur getrocknet und 10min in TBS rehydriert. Alle folgenden Schritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen, welche beispielsweise durch van der Waals'sche Wechselwirkungskräfte entstehen könnten, wurden die Präparate 20min lang mit TBS inkubiert, welchem 20% Schweineserum zugesetzt war.

Nach der Entfernung überschüssiger Flüssigkeit wurden die Präparate für 60min mit dem konzentrierten Primärantikörper EC1 inkubiert. Anschließend wurde 3mal in TBS gewaschen, der Brückenantikörper im Überschuss aufgetragen und über einen Zeitraum von 30min auf den Präparaten belassen. Es wurde wiederum 3mal gewaschen und letztendlich 30min lang mit dem APAAP- Komplex inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten wurde, um die Reaktion zu verstärken, ein zweites Mal im Überschuss Brückenantikörper für 15min aufgetragen. Nach drei Waschgängen wurde wiederum mit dem APAAP- Komplex 15min inkubiert. Anschließend wurde wieder dreimal mit TBS gewaschen und es erfolgte die Detektion spezifisch gebundener alkalischer Phosphatase mit Hilfe des Substrates Naphtol - AS - BI - Phosphat im gängigen Färbecocktail, welcher zur Blockierung endogener alkalischer Phosphatase 1mM Levamisole enthielt. Als Chromogen diente Neufuchsin. Zuletzt wurden die Zellkerne mit einer sauren Hämalaunlösung (Rezeptur nach Mayer, 1920) 2min ange-

färbt, die Präparate 10min lang unter fließendem Leitungswasser gebläut und mit Kaiser`s Glyceringelatine eingedeckt.

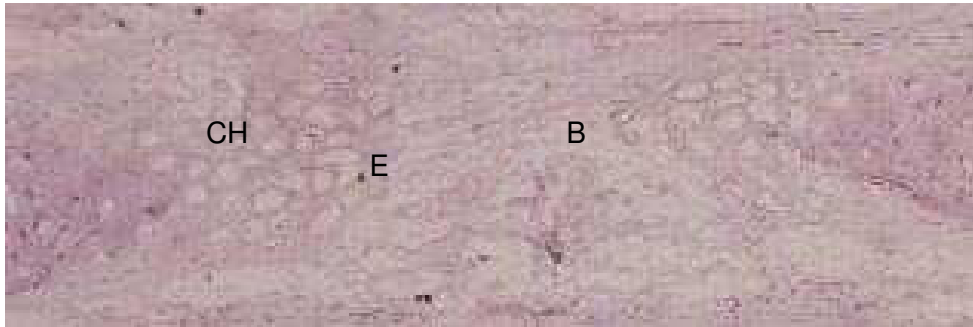


Abbildung 32: Immunhistochemischer Endothelnachweis € in der Gruppe GL, 5fache Vergrößerung, Chondrozyten (CH), in den Perforationsdefekt eingesprosses Bindegewebe (B).



Abbildung 33: Immunhistochemischer Endothelnachweis (E) in der Gruppe GL, 40fache Vergrößerung.



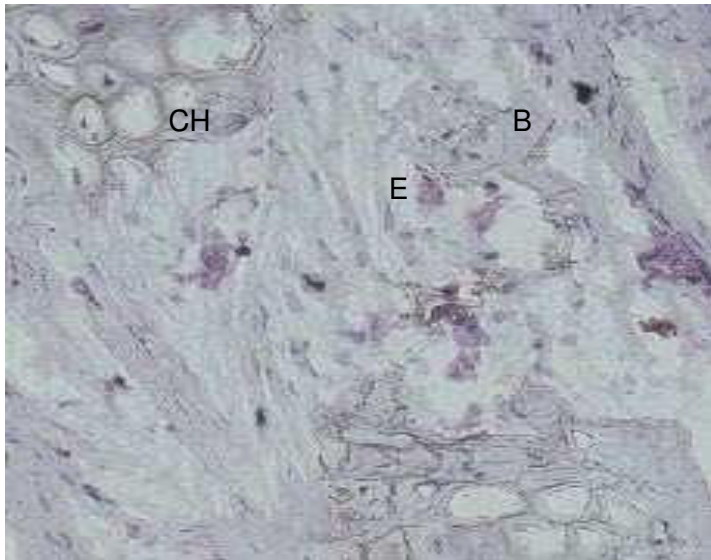


Abbildung 34: Immunhistochemischer Endothelnachweis (E) in der Gruppe KL, 20fache Vergrößerung, in den Perforationsdefekt eingesprosses Bindegewebe (B), Chondrozyten (CH).



Abbildung 35: Immunhistochemischer Endothelnachweis (E) in der Gruppe KO, 20fache Vergrößerung, Chondrozyten (CH).

Die Befundung der immunhistologischen Schnitte erfolgte in Durchlichtmikroskopie unter Berücksichtigung folgender Kriterien:

- Morphologie und Lokalisation der immunhistochemisch detektierten Gefäße
- Anzahl der nachgewiesenen Gefäße

Wie bereits in Kapitel 3.9.4 beschrieben, wurde das semiquantitative Scoreverfahren zur Darstellung der Ausprägung der Merkmale herangezogen.

### 3 Material und Methodik

---

Die Beurteilung der betrachteten histologischen Parameter und deren Zuordnung zu einer bestimmten Scorestufe erfolgte nach dem Gesamteindruck des Betrachters und dem Auftreten von typischen Zellen und histologischen Phänomenen.

Lokalisation des Endothelfärbenachweises: - Stanzungsbereich - Perichondrium - sonstige	+++ ++ +
Anzahl der nachgewiesenen Gefäße im Perichondrium: - zahlreich - wenig - keine	+++ ++ +
Anzahl der nachgewiesenen Gefäße im Stanzungsbereich: - zahlreich - wenig - keine	+++ ++ +
Methode	Positiv Negativ

Tabelle 14: Parameter zur Evaluierung der Immunhistologie.

### 3.9.6 Statistik

Zur statistischen Auswertung und Darstellung der Versuchsergebnisse wurde das Softwareprogramm SPSS V10.0® verwendet.

In der vorliegenden Studie wurden die zwei Knorpelgruppen mit großen Stanzungen (GL) und kleinen Stanzungen (KL) sowie die Kontrollgruppe (KO) jeweils in jedes der 10 Tiere implantiert. Die Anzahl von 10 Kaninchen stellt dabei die Mindestanforderung für eine statistische Auswertung der Ergebnisse dar.

Daraus ergibt sich für die mathematische Versuchsauswertung der Sachverhalt der verbundenen Stichproben.

Es wurden folgende verteilungsfreie Tests benutzt:

- Friedman Test bei  $\geq 3$  Messbedingungen
- Wilcoxon Test bei 2 Messbedingungen

Zunächst wurde primär stets der nichtparametrische Friedman Test durchgeführt. Ergab dieser Test eine exakte Signifikanz  $p < 0,05$  wurde die statistische Auswertung damit beendet.

Wurde keine exakte Signifikanz  $p > 0,05$  festgestellt wurde der Wilcoxon Test für den Paarvergleich angeschlossen.

Dabei ist es, gemäß Marcus et al. [81], aufgrund der besonderen Konstellation des Paarvergleichs bei drei Gruppen nicht notwendig, das Signifikanzniveau anzupassen.

Die Signifikanztests wurden mit einem Signifikanzniveau von  $p = 5\%$  durchgeführt. Es wurde exakt und zweiseitig getestet, soweit nicht anders angegeben. Es wurden die Maßzahlen: Median, Maximum, Minimum, Mittelwert und Standardabweichung berechnet.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in tabellarischer und graphischer Form. In den Grafiken wird der Median mit Standardabweichung, Minimum und Maximum bzw. der Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Dieser Bereich repräsentiert das 95% Konfidenzintervall der Messwerte .

Nichtquantitative Ergebnisse werden deskriptiv aufgeführt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Versuchstiere

Der vorliegenden Studie wurden die insgesamt 13 genehmigten Tiere zugeführt.

Vorzeitig schieden 2 Tiere aus:

-1 Tier (Nr. 37) aufgrund einer narkosebedingten Asystolie im letzten Drittel des dritten Eingriffs.

-1 Tier (Nr. 108) aufgrund einer narkosebedingten Asystolie in der Narkoseeinleitung für den ersten Eingriff.

Keines der Tiere wurde revisionspflichtig. Die Auswertung mit Angiographie, Planimetrie und Histologie wurde an 10 Tieren durchgeführt (Nr. 79, 80, 91, 109, 110, 111, 112, 133, 170, 171). Die immunhistochemische Auswertung der chondrokutanen Lappen wurde an dem vorzeitig ausgeschiedenen Tier Nr. 37 und an Tier Nr. 93 durchgeführt.

<b>Tiernummer</b>	<b>Auswertung</b>
37	Immunhistochemie, verstorben
79	Ausgewertet
80	Ausgewertet
91	Ausgewertet
93	Immunhistochemie
108	Verstorben
109	Ausgewertet
110	Ausgewertet
111	Ausgewertet
112	Ausgewertet
133	Ausgewertet
170	Ausgewertet
171	Ausgewertet

Tabelle 15: Versuchstiere.

## 4.2 Klinisch-makroskopische Ergebnisse

Nach Durchführung des ersten und zweiten Eingriffs konnten keine schwerwiegenden Wundheilungsstörungen im Bereich der abdominalen Wunde der 12 Tiere festgestellt werden.

3 Tiere wiesen im postoperativen Verlauf des ersten Eingriffs und 2 Tiere im postoperativen Verlauf des zweiten Eingriffs geringgradige abdominale Wundheilungsstörungen auf, die unter lokaler und systemischer antibiotischer Therapie rasch abheilten.

Am Entnahmeort des Knorpels an der Dorsalseite der Ohrconcha, traten bei einem Tier ausgeprägte Wundheilungsstörungen mit Nekroseentwicklung und wanddurchgreifender Defektbildung auf.

Im Bereich der thorakoabdominalen Hautentnahme des zweiten Eingriffs ergaben sich keine relevanten Wundheilungsstörungen.

Die klinisch-makroskopische Beurteilung der Wundheilung im Bereich der Spenderareale im Verlauf des zweiten operativen Eingriffs und der Schlußpräparation ist in Tabelle 16 wiedergegeben.

Tiernr.	Eingriff II		Schlußpräparation	
	Ohr	Abdomen	Ohr	Abdomen
37	opB	opB	opB	opB
79	opB	opB	opB	opB
80	opB	5mm Wundheilungsstörung	opB	Wundheilungsstörung cranialer Hautgraft 5mm
91	opB	opB	opB	opB
93	opB	opB	opB	opB
108	-	-	-	-
109	opB	opB	opB	Wundheilungsstörung cranialer Hautgraft
110	Nekrose 1x2cm	Wundheilungsstörung, Serom	Defekt	opB
111	opB	opB	opB	opB
112	opB	opB	opB	opB
133	opB	opB	opB	opB
170	opB	Wundheilungsstörung caudal	opB	opB
171	opB	opB	opB	opB

Tabelle 16: Klinisch-makroskopische Beurteilung der Wundheilung.

Im Verlauf des zweiten und dritten operativen Eingriffs wurden die Knorpeltransplantate und die Vollhauttransplantate ebenso zunächst klinisch-makroskopisch beurteilt. Hierbei wurde die Gewebewitalität und -integrität sowie das Vorliegen von Entzündungszeichen semiquantitativ beurteilt und nach einem Score System, siehe Tabelle 17, von 0 (avitales Knorpel/ Hauttransplantat) bis 6 (intaktes Knorpel/ Hauttransplantat) Punkte reichend, gemäß des semiquantitativen Score Systems zur Beurteilung der histopathologischen Präparate siehe Kapitel 3.9.4, klassifiziert.

Makroskopische Übereinstimmung zu Ursprungsgewebe	komplett	2
	teilweise	1
	keine	0
Erosionen	keine	2
	teilweise	1
	komplett	0
Fläche	Ausgangsfläche	2
	<100% der Ausgangsfläche	1
	<75% der Ausgangsfläche	0

Tabelle 17: Scoretabelle zur klinisch-makroskopischen Beurteilung von Knorpel- und Hauttransplantat.

Die erhobenen klinisch-makroskopischen Ergebnisse sind in Tabelle 18 und 19 dargestellt. Im Folgenden wird in den Ergebnistabellen die Knorpelgruppe mit den 4mm messenden Perforationen GL, die Knorpelgruppe mit den 1,5mm messenden Stanzungen KL und die Kontrollknorpelgruppe KO genannt.

Knorpel	GL	KL	KO
37	6	6	6
79	6	6	6
80	6	6	6
91	4	3	6
109	6	6	5
110	6	6	6
111	5	5	5
112	5	5	5
133	5	6	6
170	5	6	6
171	6	6	6

Tabelle 18: Klinisch-makroskopische Beurteilung der Knorpelvitalität.

Haut	GL	KL	KO
37	6	5	5
79	6	6	6
80	6	6	5
91	6	6	6
109	6	3	6
110	4	4	4
111	4	4	4
112	4	5	4
133	4	5	6
170	5	4	5
171	5	6	6

Tabelle 19: Klinisch-makroskopische Beurteilung der Hautvitalität.

### 4.3 Angiographie

Die an 10 Tieren durchgeführte Angiographie wurde, wie in Kapitel 3.9.2 beschrieben, ausgeführt.

Zur Darstellung der Gefäße im Untersuchungsareal wählte man die Angiographie mit Bariumsulfatperfusion unter physiologischem Druck.

Der chondrokutane Lappen wurde nach den in Kapitel 3.9.2.1 und 3.9.2.2 genannten Parametern beurteilt und quantifiziert.

Ebenso wurde an dem gefäßgestielten Hautlappen der kontralateralen Abdomenseite vorgegangen, um so einen Ausgangswert für die native Gefäßversorgung zu erhalten.

Bei der statistischen Auswertung der Angiographie wurde stets die permutierte Reihenfolge der Knorpelquadrate bezüglich des Implantationsorts berücksichtigt. Bei keinem Tier ergab sich angiographisch der Verdacht einer Thrombosierung oder Gefäßobliteration der A. epigastrica superficialis.

### 4.3.1 Quantitative Auswertung

Die folgende Tabelle zeigt die ermittelten Summen der Gefäßschnittpunkte in der Knorpelgruppe mit 4mm Perforation (GL), in der Knorpelgruppe mit 1,5mm Stanzung (KL) und in der Kontrollknorpelgruppe (KO) mit den insgesamt vier Schnittlinien (1.-4. SL) in allen 10 Tieren, sowie den jeweiligen Mittelwert (m).

	GL_1 .SL	GL_2 .SL	GL_3 .SL	GL_4 .SL	KL_1 .SL	KL_2 .SL	KL_3 .SL	KL_4 .SL	KO_1 .SL	KO_2 .SL	KO_3 .SL	KO_4 .SL
79	17	19	17	13	9	11	10	7	11	11	12	11
80	14	10	13	16	12	13	12	10	10	10	7	8
91	15	19	14	18	13	13	16	12	13	13	12	10
109	16	17	15	13	11	10	12	12	11	11	9	9
110	13	14	12	11	11	10	9	10	6	10	11	12
111	18	14	16	15	12	8	12	15	8	9	8	5
112	11	19	19	17	11	7	9	6	13	8	9	10
133	14	14	16	11	12	13	13	13	12	10	13	11
170	18	19	21	19	12	15	16	16	12	11	10	10
171	11	13	14	12	11	11	6	9	8	6	8	7
m	14,7	15,8	15,7	14,5	11,4	11,1	11,5	11,0	10,4	9,9	9,9	9,3

Tabelle 20: Quantitative Gefäßauszählung am chondrokutanen Lappen.

Die folgende Tabelle beschreibt die Gefäßschnittpunkte mit den Schnittlinien (1.-4. SL) am kontralateralen Hautlappen (n) in vergleichbaren Messarealen analog zur permutierten Anordnung von GL (gl), KL (kl) und Ko (ko) im chondrokutanen Lappen.

	ngl_1. SL	ngl_2. SL	ngl_3. SL	ngl_4. SL	nkl_1. SL	nkl_2. SL	nkl_3. SL	nkl_4. SL	nko_1 .SL	nko_2 .SL	nko_3 .SL	nko_4 .SL
79	5	6	5	4	7	5	4	4	4	4	6	4
80	11	9	7	6	6	7	6	6	5	8	8	6
91	13	9	10	11	2	3	3	3	4	3	6	6
109	5	9	8	8	7	4	3	2	4	5	5	4
110	7	5	4	4	6	4	5	5	5	6	6	5
111	8	8	10	7	4	5	5	4	6	7	5	7
112	6	7	8	7	9	7	7	6	3	3	4	7
133	4	8	6	5	3	4	8	5	1	2	4	4
170	5	5	6	6	6	7	8	9	9	9	10	7
171	5	4	4	6	3	5	3	2	5	6	4	5
m	6,9	7,0	6,8	6,4	5,3	5,1	5,2	4,6	4,6	5,3	5,8	5,5

Tabelle 21: Quantitative Gefäßauszählung am nativen Hautlappen.



Es folgen die Einzeldarstellungen der quantitativ-angiographischen Ergebnisse der Knorpelgruppen GL, KL und KO unter Berücksichtigung des äquivalenten Messareals im kontralateralen nativen Hautlappen.

Die Tabelle 22 und die dazugehörigen Abbildungen 36, 37 und 38 zeigen die Summe der Gefäßschnittpunkte in der Knorpelgruppe GL, KL und KO (siehe Tabelle 20) abzüglich der Summe der Schnittpunkte des Vergleichsareal im kontralateralen Hautlappen (siehe Tabelle 21) ngl, nkl und nko für die jeweils 10 Tiere je Schnittlinie 1-4 unter Angabe des errechneten Mittelwertes und des Konfidenzintervalls, in dem 95% der Schnittpunktsummen liegen. Diese Differenz wird im Folgenden als DGL, DKL und DKO bezeichnet.

	DGL_1_SL	DGL_2_SL	DGL_3_SL	DGL_4_SL	DKL_1_SL	DKL_2_SL	DKL_3_SL	DKL_4_SL	DKO_1_SL	DKO_2_SL	DKO_3_SL	DKO_4_SL
	GL_1. SL	GL_2. SL	GL_3. SL	GL_4. SL	KL_1. SL	KL_2. SL	KL_3. SL	KL_4. SL	KO_1 .SL	KO_2 .SL	KO_3 .SL	KO_4 .SL
	- ngl_1. SL	- ngl_2. SL	- ngl_3. SL	- ngl_4. SL	- nkl_1. SL	- nkl_2. SL	- nkl_3. SL	- nkl_4. SL	- nko_1 .SL	- nko_2 .SL	- nko_3 .SL	- nko_4 .SL
79	12	13	12	9	2	6	6	3	7	7	6	7
80	3	1	6	10	6	6	6	4	5	2	-1	2
91	2	10	4	7	11	10	13	9	9	10	6	4
109	11	8	7	5	4	6	9	10	7	6	4	5
110	6	9	8	7	5	6	4	5	1	4	5	7
111	10	6	6	8	8	3	7	11	2	2	3	-2
112	5	12	11	10	2	0	2	0	10	5	5	3
133	10	6	10	6	9	9	5	8	11	8	9	7
170	13	14	15	13	6	8	8	7	3	2	0	3
171	6	9	10	6	8	6	3	7	3	0	4	2
m	7,8	8,8	8,9	8,1	6,1	6,0	6,3	6,4	5,8	4,6	4,1	3,8

Tabelle 22: Darstellung der Differenz von quantitativer Gefäßauszählung am chondrokutanen Lappen und am nativen Hautlappen.

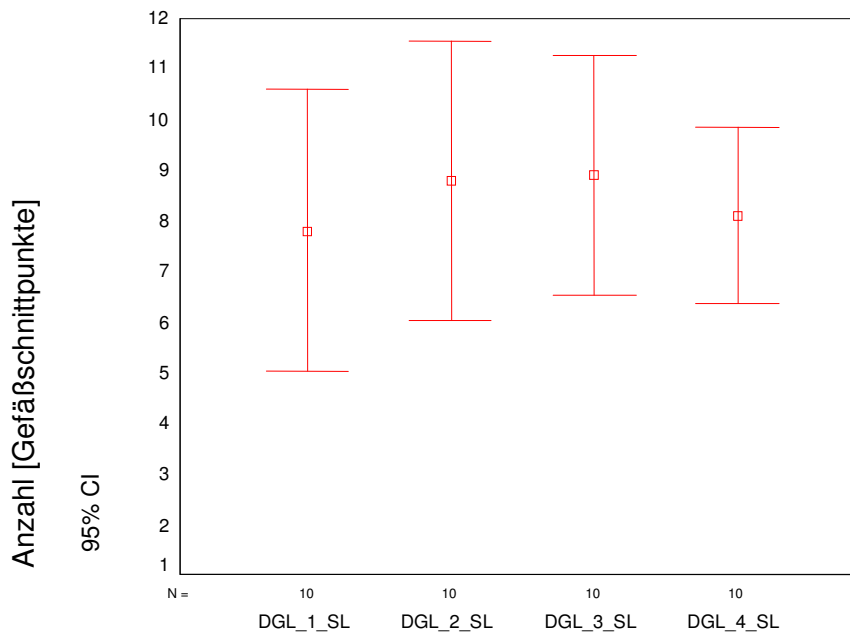


Abbildung 36: DGL\_1\_SL bis DGL\_4\_SL: Quantitativ-angiographische Darstellung der Gefäßschnittpunkte in der Knorpelgruppe GL je Schnittlinie 1-4, abzüglich der jeweiligen Werte an der kontralateralen Seite, n=10.

Innerhalb der Knorpelgruppe GL lässt sich keine signifikante Zu- oder Abnahme der Gefäßschnittpunktanzahl im Verlauf der von kaudal nach kranial zu liegenden Schnittlinien erkennen.

Im Folgenden wird die Summe der Schnittpunkte in der Knorpelgruppe KL abzüglich der Summe der Schnittpunkte in dem äquivalenten nativen Hautlappen nkl (DKL) je Schnittlinie für alle 10 Tiere gemäß Tabelle 20 graphisch dargestellt, unter Berücksichtigung des errechneten Mittelwertes und des Konfidenzintervalls, in dem 95% der Schnittpunktsummen liegen.

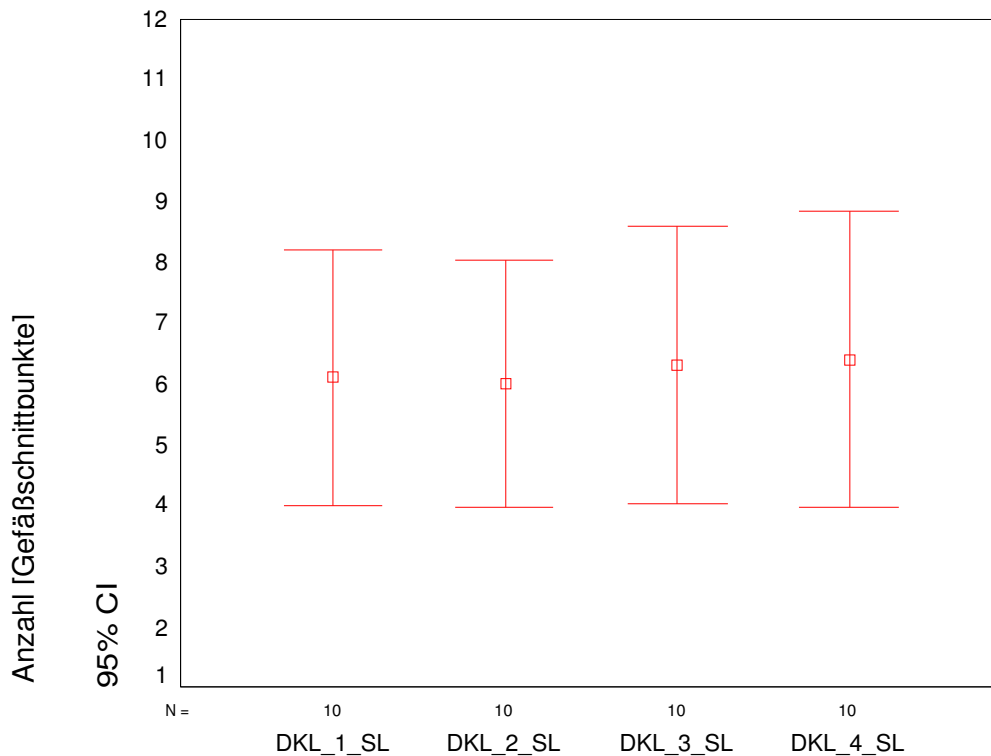


Abbildung 37: DKL\_1\_SL bis DKL\_4\_SL: Quantitativ-angiographische Darstellung der Gefäßschnittpunkte in der Knorpelgruppe KL je Schnittlinie 1-4, abzüglich der jeweiligen Werte an der kontralateralen Seite, n=10.

Innerhalb der Knorpelgruppe KL lässt sich keine signifikante Zu- oder Abnahme der Gefäßschnittpunktanzahl im Verlauf der von kaudal nach kranial zu liegenden Schnittlinien.

Im Folgenden ist die Differenz (DKO) der Summe der Schnittpunkte je Schnittlinie in der Kontrollknorpelgruppe KO und der Hautvergleichsfläche des unmanipulierten Hautlappens nko, gemäß Tabelle 20, unter Berücksichtigung des errechneten Mittelwerts und des Konfidenzintervalls, in dem 95% Schnittpunktsummen liegen, dargestellt.

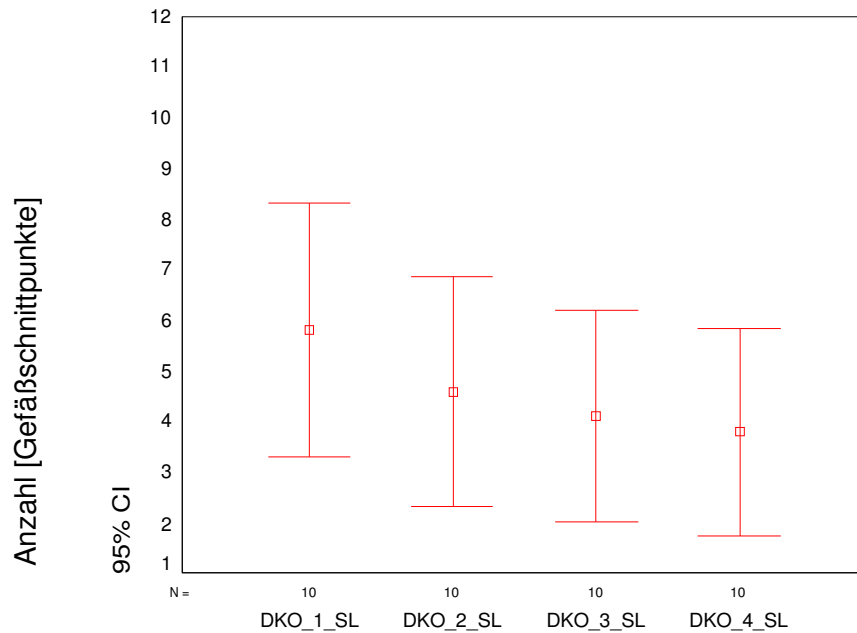
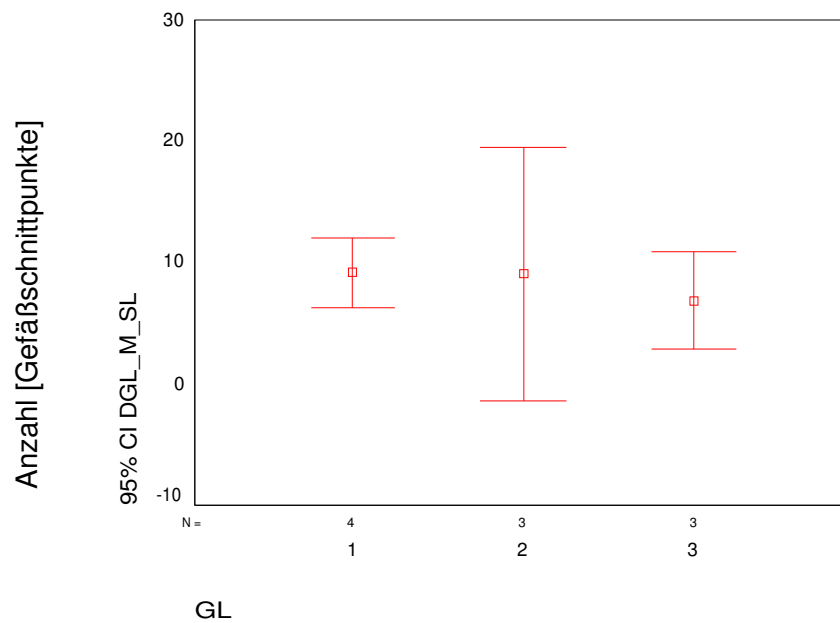


Abbildung 38: DKO\_1\_SL bis DKO\_4\_SL: Quantitativ-angiographische Darstellung der Gefäßschnittpunkte in der Knorpelgruppe KO je Schnittlinie 1-4, abzüglich der jeweiligen Werte an der kontralateralen Seite, n=10.

Innerhalb der Kontrollknorpelgruppe KO zeigte sich keine signifikante Zu- oder Abnahme der Gefäßschnittpunktanzahl im Verlauf der von kaudal nach kranial zu liegen kommenden Schnittlinien.

Es wurde der Einfluss der Position 1/2/3 entsprechend kaudal/ mittig/ kranial der einzelnen Knorpelimplantate auf die quantitativ angiographisch ermittelten Ergebnisse untersucht.

Dazu wurde jeweils für GL, KL und KO getrennt in Abhängigkeit von der Position die Mittelwerte der Gesamtschnittpunktmengen pro Knorpelquadrat DGL\_M\_SL, DKL\_M\_SL, DKO\_M\_SL, die im Konfidenzintervall liegen, aufgetragen.

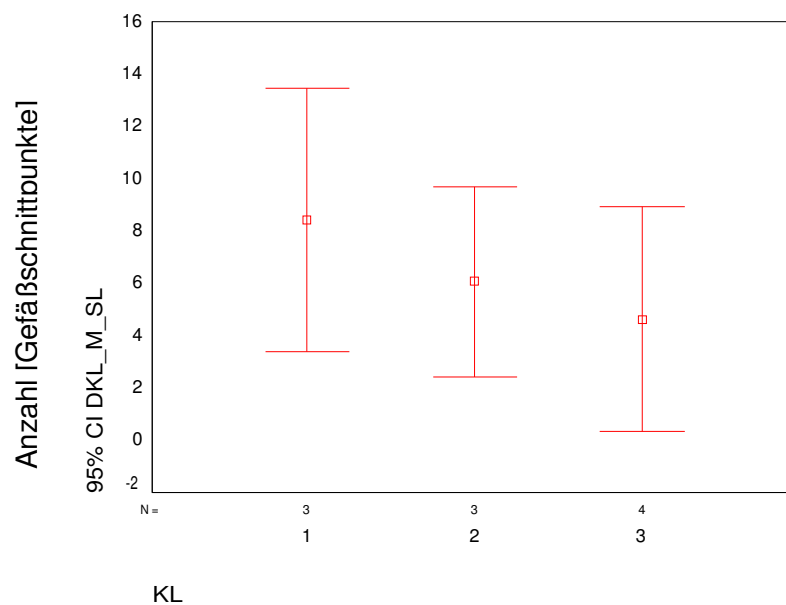


Position 1/2/3

Abbildung 39: Abhängigkeit der Anzahl der Gefäßschnittpunkte von der Position 1/kaudal, 2/mittig, 3/kranial des Knorpelquadrats GL.

Die Knorpelquadrate der Kontrollgruppe GL wurden 4mal an Position 1/ kaudal, 3mal an Position 2/ mittig und 3mal an Position 3/ kranial genäht.

Die Mittelwerte der Gesamtschnittpunktmengen DGL\_M\_SL für Position 1, 2 und 3 zeigen keinen relevanten Unterschied im Positionsvergleich.



## Position 1/2/3

Abbildung 40: Abhängigkeit der Anzahl der Gefäßschnittpunkte von der Position 1/kaudal, 2/mittig, 3/kranial des Knorpelquadrats KL.

Die Knorpelquadrate der Kontrollgruppe KL wurden 3mal an Position 1/ kaudal, 3mal an Position 2/ mittig und 4mal an Position 3/ kranial genäht.

Die Mittelwerte der Gesamtschnittpunktmengen DKL\_M\_SL für Position 1, 2 und 3 zeigen keinen relevanten Unterschied im Positionsvergleich.

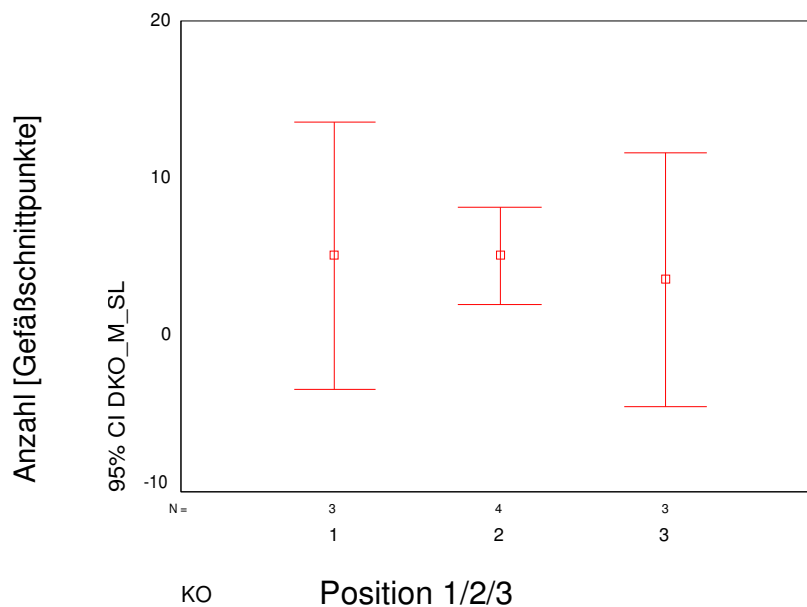


Abbildung 41: Abhängigkeit der Anzahl der Gefäßschnittpunkte von der Position 1/ kaudal, 2/ mittig, 3/ kranial der Kontrollgruppe KO.

Die Knorpelquadrate der Kontrollgruppe KO wurden 3mal an Position 1/ kaudal, 4mal an Position 2/ mittig und 3mal an Position 3/ kranial genäht.

Die Mittelwerte der Gesamtschnittpunktmengen DKO\_M\_SL für Position 1, 2 und 3 zeigen keinen relevanten Unterschied im Positionsvergleich.

Gemäß der graphischen Darstellungen wird deutlich, dass die Position der Knorpelquadrate zu keinen eindeutigen Veränderungen von Dgl\_M\_SL, Dkl\_M\_SL und Dko\_M\_SL führt.

Damit konnte gezeigt werden, dass die angiographischen Ergebnisse von der Implantationsposition kaudal, mittig und kranial weitgehend unbeeinflusst und davon unabhängig zu betrachten sind.

Auf eine Ermittlung der exakten Signifikanz wurde damit verzichtet.

Der wesentliche Versuchsaspekt der quantitativ angiographischen Auswertung wird im nächsten Punkt erläutert:

Es handelt sich hierbei um den direkten Vergleich der angiographisch ermittelten Gefäßversorgung zwischen den Knorpelquadranten GL, KL und KO nach achtwöchiger Einheilungsphase und damit einer Darstellung der Unterschiede bezüglich Neovaskularisation in den zwei Untersuchungsgruppen GL und KL verglichen mit der Kontrollgruppe KO.

Im Folgenden werden DGL\_M\_SL, DKL\_M\_SL und DKO\_M\_SL unter Berücksichtigung des Konfidenzintervalls dargestellt.

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
						25 <sup>th</sup>	50 <sup>th</sup>	75 <sup>th</sup>
DGL_M_SL	10	8,4000	2,59	5,00	13,75	7,062	7,750	10,00
DKL_M_SL	10	6,2000	2,56	1,00	10,75	4,812	6,625	7,375
DKO_M_SL	10	4,5750	2,61	1,25	8,75	2,000	4,875	6,875

Tabelle 23: Deskriptive Statistik , DGL\_M\_SL, DKL\_M\_SL, DKO\_M\_SL.

Mit Hilfe des Wilcoxon Tests wurden jeweils zwei Gruppen verglichen.

	DKL_M_SL – DGL_M_SL	DKO_M_SL – DGL_M_SL	DKO_M_SL - DKL_M_SL
Exact Sig.(2 seitiger Test)	,088	,010	,186

Tabelle 24: Wilcoxon Test.

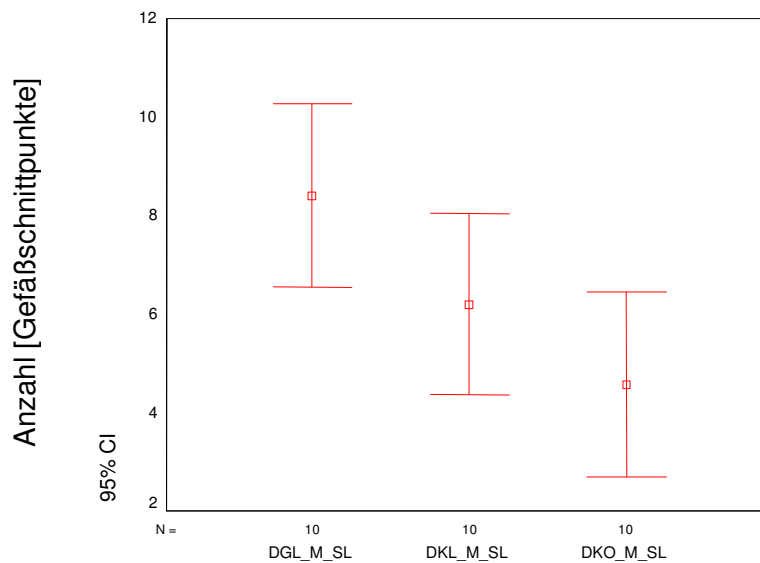


Abbildung 42: Quantitativ-angiographischer Gruppenvergleich.

Daraus ergibt sich für den Gruppenvergleich zwischen der nativen Kontrollgruppe DKO\_M\_SL und der Gruppe DGL\_M\_SL ein signifikanter Unterschied mit  $p=0,010$ . Im Mittel wurden in der Knorpelvariante GL mit den 4mm messenden Stanzungen somit angiographisch signifikant mehr Gefäßschnittpunkte ermittelt als in der Kontrollgruppe KO. Es ergab sich ein Trend zugunsten von GL im Gruppenvergleich GL/KL jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen GL/ KL und KL/ KO.

Abschließend wurde die Fragestellung der effektiven Neovaskularisation im Vergleich zur iatrogen induzierten Granulationsgewebepildung evaluiert.

Dabei wurde davon ausgegangen, dass die Differenz an Gefäßschnittpunkten zwischen der Gruppe DKO\_M\_SL und dem kontralateralen Vergleichshautlappen DnKO\_M\_SL einer Granulations- und Fibrosereaktion entspricht.

Diese operativ bedingten Umbauvorgänge wurden jeweils von DGL\_M\_SL und DKL\_M\_SL subtrahiert, um die effektive im Bereich der Stanzung liegende Kapillarisation in der Gruppe GL genannt DGL\_EFF und in der Gruppe KL genannt DKL\_EFF statistisch auszuwerten.



	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
						25 <sup>th</sup>	50 <sup>th</sup>	75 <sup>th</sup>
DGL_EFF	10	3,8250	3,7287	-1,50	11,75	1,500	3,500	5,687
DKL_EFF	10	1,6250	3,4826	-4,75	6,00	-1,375	2,625	4,125

Tabelle 25: Deskriptive Statistik, DGL\_EFF und DKL\_EFF.

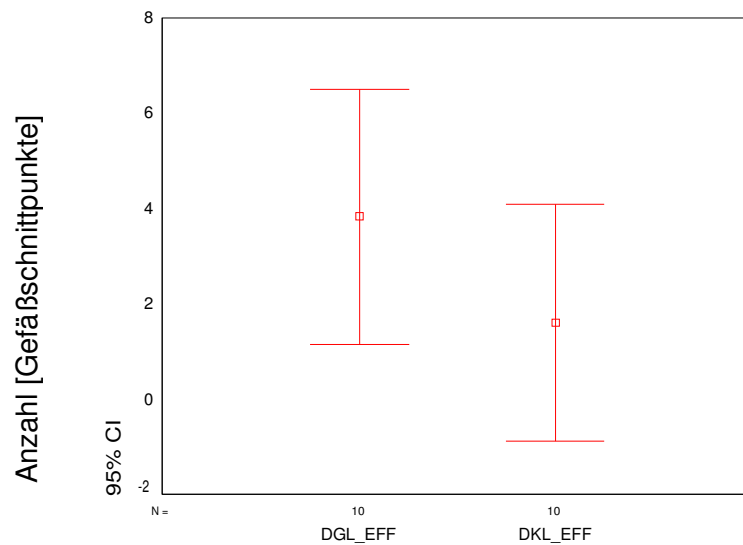


Abbildung 43: Quantitativ-angiographischer Gruppenvergleich DGL\_EFF und DKL\_EFF.

Nach Bereinigung der Ergebnisse und Subtraktion der operationsbedingten Granulationsprozesse konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen GL und KL in der Kategorie effektive, angiographisch nachweisbare Kapillarisation nachgewiesen werden.

### 4.3.2 Qualitative Auswertung

Im Folgenden werden die Gruppen GL, KL und die Kontrollgruppe KO gemäß der Kapitel 3.9.2.1 und 3.9.2.2 angiographisch nach arterieller und venöser Gefäßversorgung unterschieden. Gemäß des Scores in Kapitel 3.9.2.2 erfolgt die Auswertung zusätzlich unter Berücksichtigung der Gefäßkalibern A, B und C. Die Darstellung erfolgt unter Berücksichtigung der Gefäßversorgung im nativen, kontralateralen Hautlappen.

	GLArt.A	GLArt.B	GLArt.C	GLVen.A	GLVen.B	GLVen.C
79	4	2	8	6	5	4
80	2	5	8	3	2	6
91	3	5	7	3	5	7
109	6	3	8	6	3	4
110	4	3	8	4	2	4
111	4	5	8	4	2	6
112	4	5	8	4	2	5
133	3	4	8	4	3	7
170	3	7	8	5	4	3
171	3	4	7	4	2	4

Tabelle 26: Qualitative, kombinierte arterielle und venöse Ergebnisdarstellung von GL.

	nglArt.A	nglArt.B	nglArt.C	nglVen.A	nglVen.B	nglVen.C
79	2	2	7	2	0	0
80	5	6	7	6	2	4
91	4	2	0	4	2	0
109	1	1	7	1	1	2
110	3	4	6	4	4	1
111	1	2	1	1	2	2
112	4	2	0	4	2	0
133	1	1	7	1	0	2
170	1	7	8	3	3	4
171	3	2	2	4	1	1

Tabelle 27: Qualitative, kombinierte arterielle und venöse Ergebnisdarstellung von ngl.

#### 4 Ergebnisse

	KLArt.A	KLArt.B	KLArt.C	KLVen.A	KLVen.B	KLVen.C
79	4	6	7	4	1	2
80	5	5	4	0	0	0
91	2	5	8	5	3	1
109	5	2	4	4	2	2
110	3	4	7	4	3	6
111	3	3	2	3	3	1
112	4	3	5	4	0	2
133	3	2	6	3	7	3
170	3	4	7	3	2	2
171	5	3	3	4	1	0

Tabelle 28: Qualitative, kombinierte arterielle und venöse Ergebnisdarstellung von KL.

	nklArt.A	nklArt.B	nklArt.C	nklVen.A	nklVen.B	nklVen.C
79	4	4	4	3	0	2
80	1	3	7	3	2	6
91	4	1	0	4	0	0
109	4	4	6	4	0	0
110	1	3	6	4	2	4
111	2	0	3	0	0	1
112	4	2	2	4	2	1
133	5	3	3	4	1	0
170	1	2	6	5	3	2
171	4	1	0	2	0	0

Tabelle 29: Qualitative, kombinierte arterielle und venöse Ergebnisdarstellung von nkl.

	KOArt.A	KOArt. B	KOArt. C	KOVen.A	KOVen.B	KOVen. C
79	8	6	6	4	1	0
80	4	3	5	0	0	0
91	1	6	6	7	2	0
109	1	5	2	3	5	1
110	3	2	5	3	2	5
111	6	4	4	5	2	0
112	3	7	3	6	1	1
133	4	5	5	4	5	2
170	2	5	2	4	0	0
171	2	4	4	2	4	2

Tabelle 30: Qualitative, kombinierte arterielle und venöse Ergebnisdarstellung von KO.

	nkoArt.A	nkoArt.B	nkoArt.C	nkoVen.A	nkoVen.B	nkoVen.C
79	8	0	4	7	0	0
80	0	5	8	0	4	6
91	8	3	2	6	0	0
109	7	3	4	6	1	1
110	0	5	8	3	3	6
111	3	3	3	4	1	0
112	4	5	2	4	4	2
133	6	1	2	6	0	0
170	4	3	8	4	2	5
171	4	4	4	4	1	2

Tabelle 31: Qualitative, kombinierte arterielle und venöse Ergebnisdarstellung von nko.

Vergleicht man die Ergebnisse der beiden Gruppen GL, KL und der Kontrollgruppe KO des chondrokutanen Lappens mit den Ausgangswerten im unbeeinflussten Präparat des nativen Hautlappens, unter Berücksichtigung der korrekten Knorpelposition auch im kontralateralen Vergleichslappen, stellt die Differenz der Ergebnisse die postoperative Granulationsgewebe- und Kapillarneubildung im operierten Areal dar.

Daher wurde in einem Gruppenvergleich zwischen GL, KL und KO ein quantitativer angiographischer Unterschied zwischen den Stanzungsgruppen und der Kontrollgruppe als positives Versuchsergebnis gewertet, da dies als Hinweise auf Neovaskularisation interpretiert wurde.

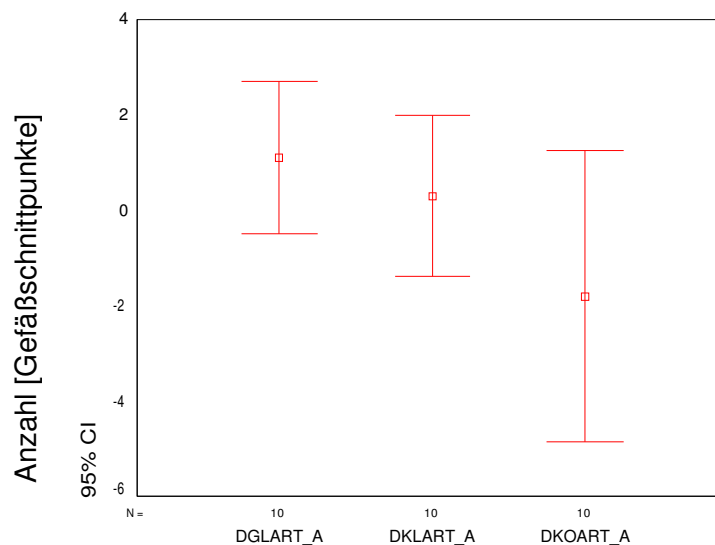


Abbildung 44: Qualitativ-angiographische Ergebnisdarstellung DGL, DKL und DKO für die Kategorie Arterie, Gefäßkaliber A, n=10.

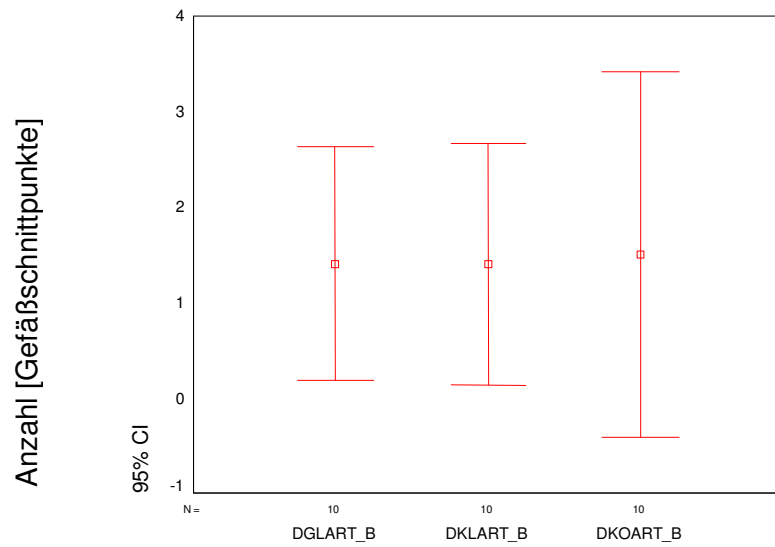


Abbildung 45: Qualitativ-angiographische Ergebnisdarstellung DGL, DKL und DKO für die Kategorie Arterie, Gefäßkaliber B, n=10.

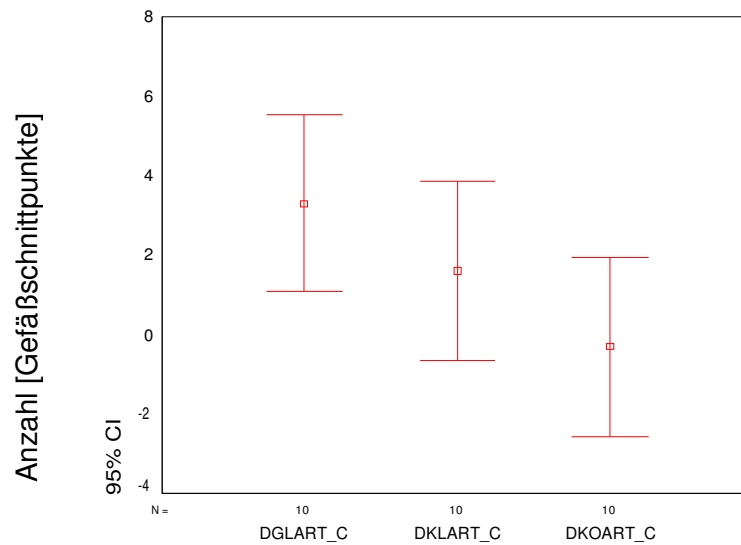


Abbildung 46: Qualitativ-angiographische Ergebnisdarstellung DGL, DKL und DKO für die Kategorie Arterie, Gefäßkaliber C, n=10.

	DGL ART_ A	DGL ART_ B	DGL ART_ C	DKL ART_ A	DKL ART_ B	DKL ART_ C	DKO ART_ A	DKO ART_ B	DKO ART_ C
79	2	0	1	0	2	3	0	6	2
80	-3	-1	1	4	2	-3	4	-2	-3
91	-1	3	7	-2	4	8	-7	3	4
109	5	2	1	1	-2	-2	-6	2	-2
110	1	-1	2	2	1	1	3	-3	-3
111	3	3	7	1	3	-1	3	1	1
112	0	3	8	0	1	3	-1	2	1
133	2	3	1	-2	-1	3	-2	4	3
170	2	0	0	2	2	1	-2	2	-6
171	0	2	6	1	2	3	-2	0	0
m	1,1	1,4	3,4	0,7	1,4	1,6	-1,0	1,5	-0,3

Tabelle 32: Qualitativ-angiographische Darstellung DGL, DKL und DKO für die Kategorie Arterie, Gefäßkaliber A,B,C.

	DGLART_A DKLART_A DKOART_A	DGLART_B DKLART_B DKOART_B	DGLART_C DKLART_C DKOART_C
N	10	10	10
Chi - Square	3,829	0,514	5,243
Df	2	2	2
Asymp. Sig.	0,147	0,773	0,073
Exact Sig.	0,153	0,790	0,071
Point Probability	0,018	0,034	0,007

Tabelle 33: Statistische Auswertung der qualitativ-angiographischen Ergebnisse DGL, DKL und DKO für die Kategorie Arterie, Gefäßkaliber A,B,C.

Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen in der arteriellen Auswertung in der Gefäßkaliberklassen A und B. Die nahe am Signifikanzniveau ( $p < 0,05$ ) liegende exakte Signifikanz von 0,071 in der Größenklasse C, die das Kapillaräquivalent darstellt, wurde mit Hilfe des Wilcoxon Tests im direkten Gruppenvergleich weiter aufgeschlüsselt.

Dabei zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen GL und KO in der arteriellen Auswertung im Gefäßkaliber C mit  $p= 0,008$  ( $p < 0,05$ ). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen KL und GL sowie KO und KL.

Im Folgenden erfolgt die analoge Auswertung für die Gefäßkategorie Vene.

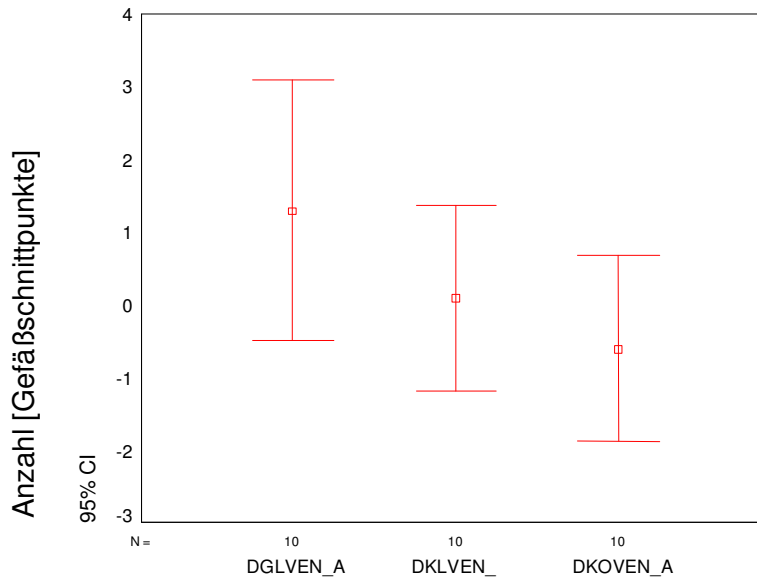


Abbildung 47: Qualitativ-angiographische Ergebnisdarstellung DGL, DKL und DKO für die Kategorie Vene, Gefäßkaliber A, n=10.

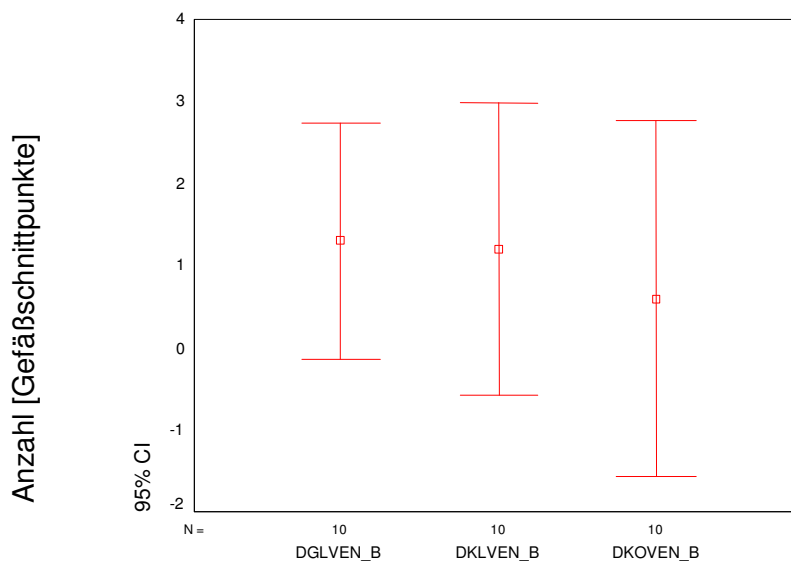


Abbildung 48: Qualitativ-angiographische Ergebnisdarstellung DGL, DKL und DKO für die Kategorie Vene, Gefäßkaliber B, n=10.

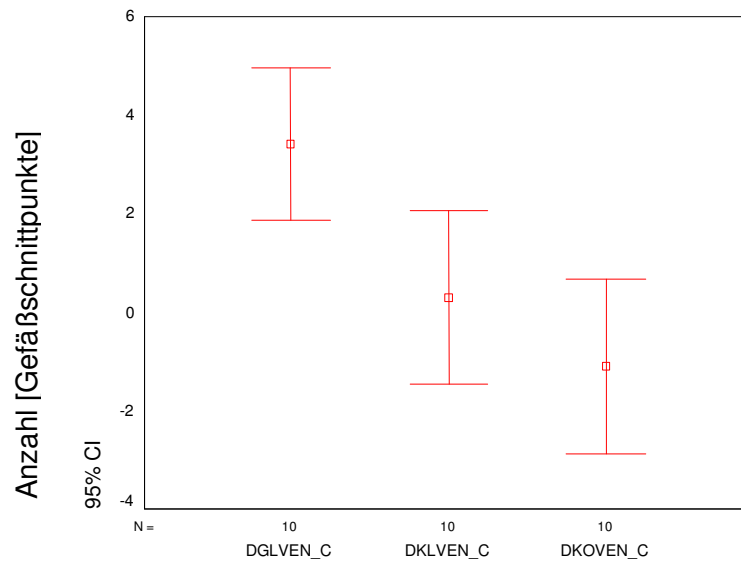


Abbildung 49: Qualitativ-angiographische Ergebnisdarstellung DGL, DKL und DKO für die Kategorie Vene, Gefäßkaliber C.

	DGL VEN_ A	DGL VEN_ B	DGL VEN_ C	DKL VEN_ A	DKL VEN_ B	DKL VEN_ C	DKO VEN_ A	DKO VEN_ B	DKO VEN_ C
79	4	5	4	1	1	0	-3	1	0
80	-3	0	2	-3	-2	-6	0	-4	-6
91	-1	3	7	1	3	1	1	2	0
109	5	2	2	0	2	2	-3	4	0
110	0	-2	3	0	1	2	0	-1	-1
111	3	0	4	3	3	0	1	1	0
112	0	0	5	0	-2	1	2	-3	-1
133	3	3	5	-1	6	3	-2	5	2
170	2	1	-1	-2	-1	0	0	-2	-5
171	0	1	3	2	1	0	-2	3	0
m	1,3	1,5	3,4	0,1	1,2	0,3	-0,6	0,6	-1,1

Tabelle 34: Qualitativ-angiographische Darstellung DGL, DKL und DKO für die Kategorie Vene, Gefäßkaliber A,B,C.



	DGLVEN_A DKLVEN_A DKOVEN_A	DGLVEN_B DKLVEN_B DKOVEN_B	DGLVEN_C DKLVEN_C DKOVEN_C
N	10	10	10
Chi - Square	1,563	1,167	15,600
Df	2	2	2
Asymp. Sig.	0,458	0,558	0,00
Exact Sig.	0,494	0,586	0,00
Point Probability	0,029	0,052	0,00

Tabelle 35: Qualitativ-angiographische Auswertung DGL, DKL und DKO für die Kategorie Vene, Gefäßkaliber A,B,C.

Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen in der qualitativ-angiographischen Auswertung in der Kategorie Vene in den Gefäßkaliberklassen A und B. Der signifikante Unterschied 0,00 der drei Gruppen in der Größenklasse C, die das Kapillaräquivalent darstellt, wurde mit Hilfe des Wilcoxon Tests im direkten Gruppenvergleich weiter aufgeschlüsselt.

Dabei zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen allen Gruppen GL, KL und KO untereinander in der venösen Auswertung im Gefäßkaliber C mit  $p=0,012$ ,  $p=0,002$ ,  $p=0,031$  ( $p < 0,05$ ).

Im Folgenden wird jeweils innerhalb einer Gruppe das Gefäßkaliber C in arterieller und venöser Auswertung dargestellt.

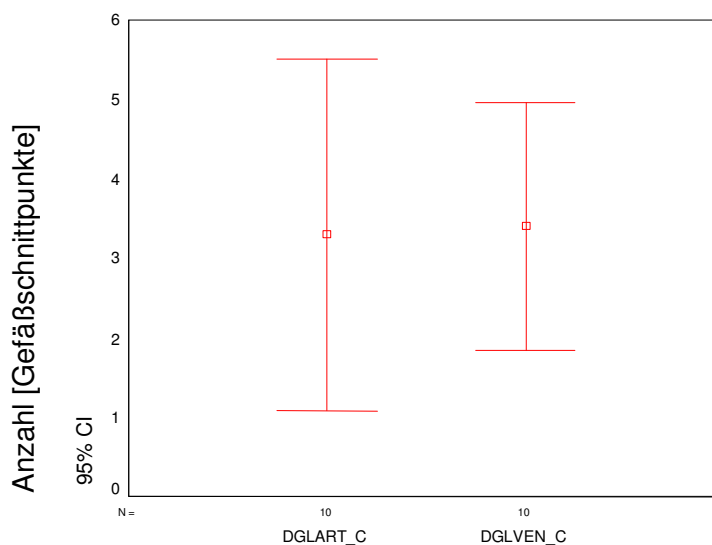


Abbildung 50: Qualitativ-angiographischer Vergleich arteriell und venös im Gefäßkaliber C innerhalb der Knorpelgruppe GL.

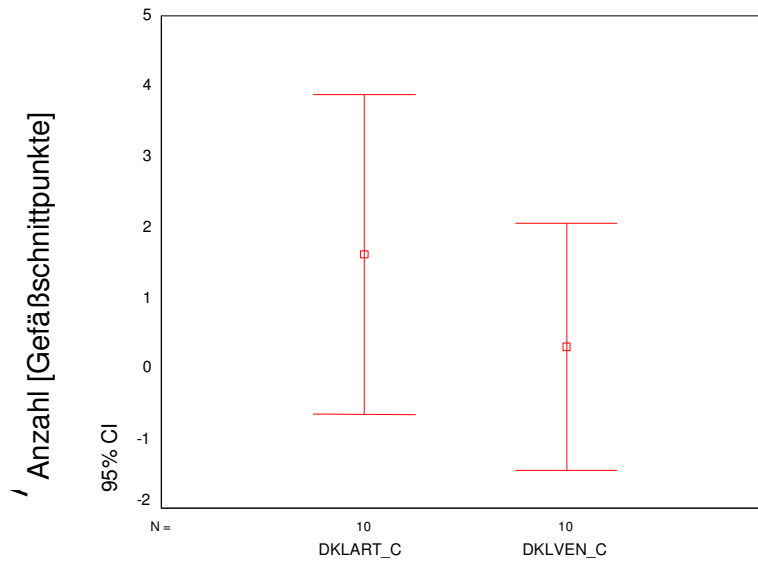


Abbildung 51: Qualitativ-angiographischer Vergleich arteriell und venös im Gefäßkaliber C innerhalb der Knorpelgruppe KL.

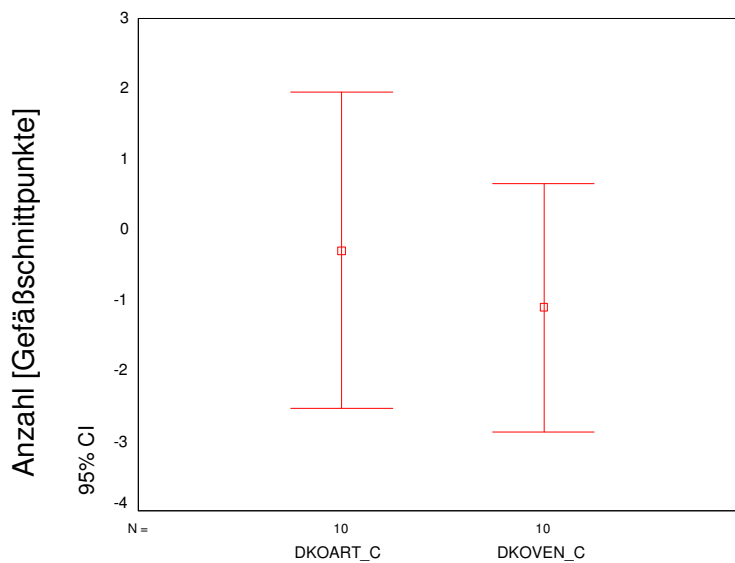


Abbildung 52: Qualitativ-angiographischer Vergleich arteriell und venös im Gefäßkaliber C innerhalb der Knorpelgruppe KO.

In keiner Gruppe GL, KL und KO zeichnete sich ein signifikanter Unterschied in der Gefäßgröße C im direkten Vergleich arterielles versus venöses Gefäßsystem ab.

#### 4.4 Planimetrie

Mit dem planimetrischen Auswertungsverfahren sollte ermittelt werden, ob die Schrumpfungstendenz bzw. die ischämische Involution des Vollhauttransplantats auf der Knorpelvariante GL bzw. KL durch verbesserte, transcartilaginäre Vaskularisation geringer ausfällt als in der Kontrollgruppe KO. Bei dieser Auswertungsmethode wurde ein möglicher Einfluss der Position 1/2/3 entsprechend kaudal, Mitte, kranial ebenso berücksichtigt. Die dreimalig durchgeführte Flächenmessung der Vollhauttransplantate der Kontrollgruppe KO, der Gruppe GL und KL zum Implantationszeitpunkt und nach vierwöchiger Einheilungsphase kommt in folgender Tabelle zur Darstellung. Die Angaben sind in qcm angegeben.

	1.1KO	1.2KO	1.3KO	2.1KO	2.2KO	2.3KO	KO_1m	KO_2m
79	4,33	4,95	4,88	3,07	2,99	3,02	4,72	3,03
80	4,71	4,33	4,56	2,52	2,36	2,20	4,53	2,36
91	4,88	4,70	4,99	3,05	3,08	3,15	4,86	3,09
109	3,94	4,24	4,13	2,63	2,39	2,31	4,10	2,44
110	4,18	4,25	3,57	2,71	2,18	1,89	4,00	2,26
111	5,08	3,61	3,73	1,87	2,74	1,71	4,14	2,11
112	4,11	3,95	4,33	2,88	2,42	2,37	4,13	2,56
133	6,11	5,89	5,99	1,64	2,97	1,41	5,99	2,01
170	6,29	6,25	6,33	2,77	2,80	2,49	6,29	2,69
171	5,98	5,99	5,92	3,76	3,79	3,89	5,96	3,81

Tabelle 36: Planimetrie KO, Messzeitpunkt 1 und 2 (1., 2.), Position (1, 2, 3), Mittelwert zum Messzeitpunkt 1 und 2 (1m, 2m).

	1.1KL	1.2KL	1.3KL	2.1KL	2.2KL	2.3KL	KL_1m	KL_2m
79	5,67	5,63	5,57	2,65	2,73	3,43	5,62	2,94
80	4,65	4,25	4,32	3,12	3,56	3,42	4,41	3,37
91	4,11	4,41	4,24	3,81	2,95	1,90	4,25	2,89
109	2,98	3,02	3,16	2,29	2,59	1,94	3,05	2,27
110	4,00	4,25	3,58	2,99	2,46	1,67	3,94	2,37
111	6,00	4,47	6,14	3,43	2,26	3,61	5,54	3,10
112	5,03	5,09	5,10	2,53	2,46	2,14	5,07	2,38
133	4,29	4,22	4,25	3,68	3,69	3,67	4,25	3,68
170	4,31	4,39	4,25	1,98	1,91	1,99	4,32	1,96
171	6,68	6,74	6,94	5,02	5,39	5,23	6,79	5,21

Tabelle 37: Planimetrie KL, Messzeitpunkt 1 und 2 (1., 2.), Position (1, 2, 3),

Mittelwert zum Messzeitpunkt 1 und 2 (1m, 2m).

	1.1GL	1.2GL	1.3GL	2.1GL	2.2GL	2.3GL	GL_1m	GL_2m
79	6,01	5,89	5,97	3,49	2,35	3,28	5,96	3,04
80	5,99	5,65	5,89	2,99	3,01	2,97	5,84	2,99
91	3,89	3,61	3,80	3,35	2,96	2,76	3,77	3,02
109	3,76	4,10	4,55	3,17	3,57	3,31	4,14	3,35
110	4,46	4,75	3,74	3,13	3,05	2,92	4,32	3,03
111	4,47	3,25	4,62	2,62	2,51	2,46	4,11	2,53
112	5,29	4,79	5,15	4,26	2,56	3,07	5,08	3,30
133	4,99	4,64	4,89	2,89	2,78	2,99	4,84	2,89
170	4,78	4,75	4,56	3,65	3,56	3,62	4,70	3,61
171	7,65	7,14	7,40	5,51	5,75	5,78	7,40	5,68

Tabelle 38: Planimetrie GL, Messzeitpunkt 1 und 2 (3malige Messung), Mittelwert (Messzeitpunkt 1 und 2).

Die Schrumpfung der Vollhautgrafts im Rahmen des physiologischen Wundheilungsprozesses sowie die ischämische Involution nach vierwöchiger Einheilungsphase wurden als Differenz der Ausgangsfläche zur Endfläche dargestellt. Die Fläche der vitalen Vollhautabschnitte zum Zeitpunkt des letzten Eingriffs wurde in Prozent der implantierten Ausgangsfläche angegeben.

	KO %	KL %	GL %
79	64,19	52,31	51,01
80	52,10	76,42	51,20
91	63,58	68,00	80,11
109	59,51	74,43	80,92
110	56,50	60,15	70,14
111	50,97	55,96	61,56
112	61,98	46,94	64,96
133	33,55	86,59	59,71
170	42,77	45,37	76,81
171	63,93	76,73	76,76
m	54,91	73,79	67,32

Tabelle 39: Vitale Hautfläche (%) bei Explantation.

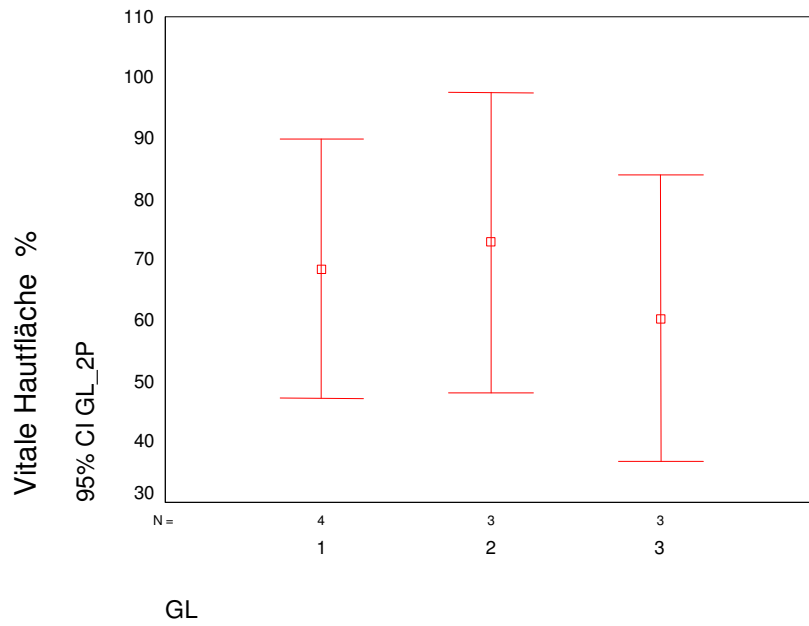


Abbildung 53: Planimetrie Positionsvergleich, GL.

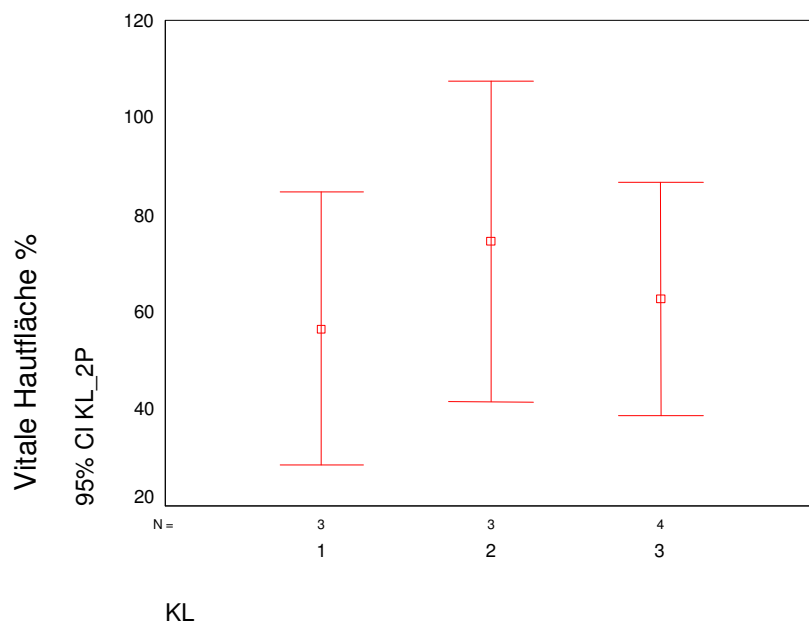


Abbildung 54: Planimetrie Positionsvergleich, KL.

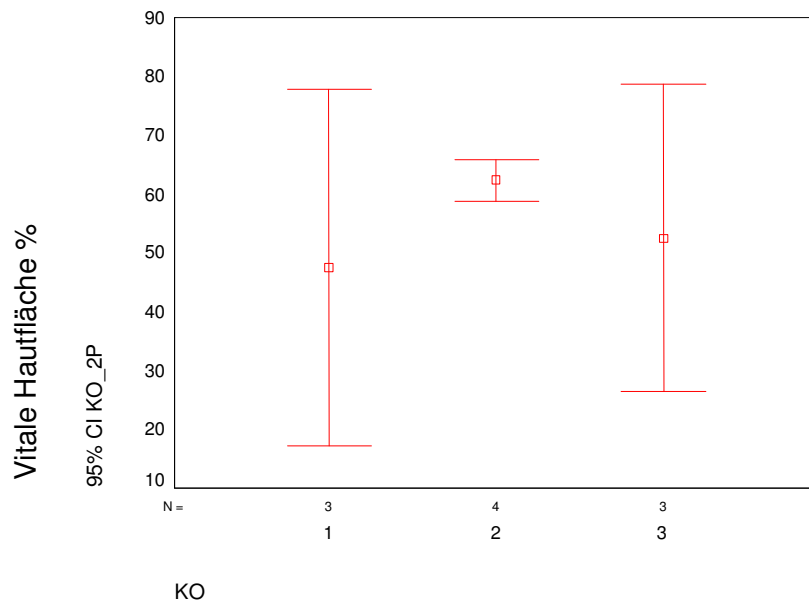


Abbildung 55: Planimetrie Positionsvergleich, KO.

Die planimetrisch ermittelten Werte der vitalen Hautfläche zum Zeitpunkt des dritten Eingriffs nach vierwöchiger Einheilungsphase wurden der statistischen Auswertung zugeführt.

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
						25 <sup>th</sup>	50 <sup>th</sup>	75 <sup>th</sup>
GL_2P	10	67,3162	11,3437	51,01	80,92	57,582	67,549	77,632
KL_2P	10	64,2897	14,1596	45,37	86,59	50,970	64,076	76,495
KO_2P	10	54,9085	10,2381	33,56	64,19	48,916	58,006	63,666

Tabelle 40: Planimetrie, deskriptive Statistik.

Im Gruppenvergleich zwischen GL und KO zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der planimetrisch ermittelten vitalen Hautfläche nach der vierwöchigen Beobachtungsdauer mit  $p=0,027$  ( $p < 0,05$ ) zu Gunsten der Gruppe GL. Es ist eine Tendenz zu höhergradiger Hautflächenerhaltung in der Gruppe GL und KL verglichen mit der Kontrollgruppe KO zu erkennen, jedoch ohne signifikanten Unterschied zwischen GL und KL sowie KL und KO.

Im folgenden Diagramm werden die Hautflächen der Gruppen GL, KL und KO bei Explantation dargestellt.

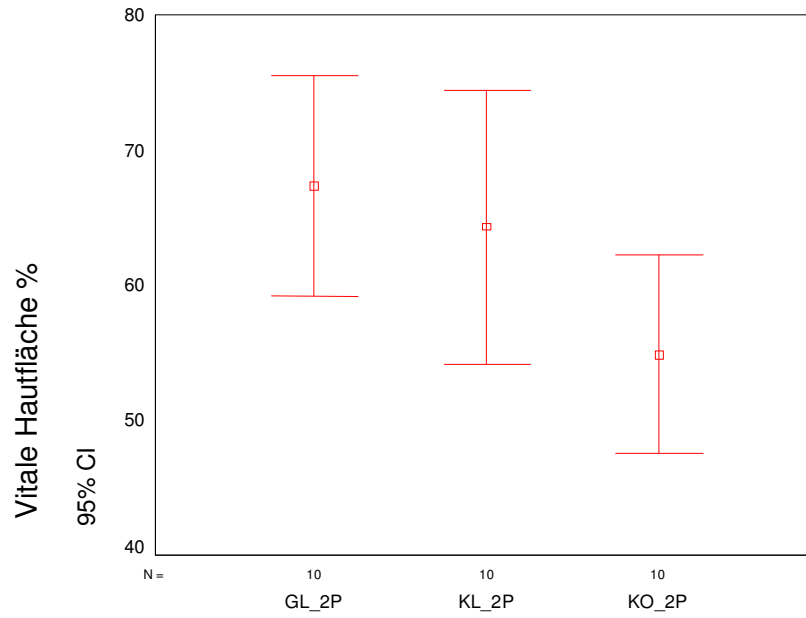


Abbildung 56: Planimetrie, Gruppenvergleich GL, KL, KO.

## 4.5 Histologie

Zur Analyse der histologisch ermittelten Daten wurde das in Kapitel 3.9.4 beschriebene semiquantitative Scoreverfahren verwendet. Dieses weist für jeden der im Folgenden dargestellten Parameter drei Ausprägungsgrade auf.

Die Gewebeschnitte wurden nach den folgenden Kriterien untersucht:

- Morphologie und Vitalität des Knorpels
- Morphologie und Vitalität der Cutis und Subcutis
- Vaskularisierung der Verschiebeschicht um den Knorpel und im Stanzbereich.

In den folgenden Ausführungen wird für jeden der betrachteten histologischen Parameter zunächst der Gesamtvergleich zwischen der 4mm Perforationsgruppe GL, der 1,5mm Stanzungsgruppe KL und der Kontrollknorpelgruppe KO und anschließend die Ergebnisse der Knorpel- und Hautparameter zusammenfassend dargestellt. Hierbei stellt der Parameter der Gefäße im Stanzbereich eine Ausnahme dar, es wurde hier nur der Gruppenvergleich GL und KL durchgeführt.

Für die statistische Auswertung der histologischen Ergebnisse wurde die permutierte Reihenfolge der Implantation (Position 1/kaudal, 2/mittig, 3/kranial) berücksichtigt.

GL	Position	Knorpel zustand	Pericho ndrium	Stanzung sbereich	Hautobe rfläche	Subcutis	Haarf ollikel	Drüsen	Dermale Gefäße
79	1	2	1	1	2	1	1	1	2
80	3	1	1	1	2	2	2	2	1
91	2	2	2	1	1	1	1	2	2
109	1	2	2	1	2	1	1	2	3
110	3	1	1	2	3	2	3	3	3
111	2	1	1	1	1	2	1	2	2
112	1	2	1	2	2	2	2	2	2
133	3	2	2	1	2	1	2	2	1
170	2	1	1	1	2	2	2	2	2
171	1	2	2	1	1	1	1	2	2

Tabelle 41: Histologische, semiquantitative Scoreauswertung des chondrokutanen Lappens GL.



KL	Position	Knorpel zustand	Pericho ndrium	Stanzung sbereich	Hautobe rfläche	Subcutis	Haarfollik el	Drüsen	Dermale Gefäße
79	3	2	1	1	2	2	1	2	3
80	2	3	2	1	2	3	2	2	3
91	1	3	2	2	2	2	2	2	3
109	3	2	1	2	2	2	2	2	2
110	2	1	2	3	2	2	2	2	2
111	1	2	2	2	3	2	2	3	3
112	3	2	2	3	3	2	2	2	2
133	2	2	3	1	3	2	2	2	2
170	1	2	2	1	2	2	2	2	3
171	3	2	1	3	2	2	1	2	2

Tabelle 42: Histologische, semiquantitative Scoreauswertung des chondrokutanen Lappens KL.

KO	Position	Knorpel zustand	Pericho ndrium	Stanzung sbereich	Hautobe rfläche	Subcutis	Haarfollik ikel	Drüsen	Dermale Gefäße
79	2	3	1	0	3	2	2	3	3
80	1	2	2	0	2	3	2	2	3
91	3	3	2	0	3	3	2	2	3
109	2	2	2	0	2	2	2	2	3
110	1	1	1	0	2	2	2	2	3
111	3	2	2	0	3	3	2	2	2
112	2	2	2	0	2	3	2	2	2
133	1	2	2	0	3	2	2	3	2
170	3	3	2	0	3	3	2	3	3
171	2	3	3	0	3	3	2	2	3

Tabelle 43: Histologische, semiquantitative Scoreauswertung des chondrokutanen Lappens KO.

Eine geringgradige Fremdkörperreaktion im Bereich der bindegewebigen Verschiebeschicht um den Knorpel an verbliebenem Fadenmaterial wurde in vier Fällen festgestellt.

Das Auftreten einer metaplastischen Umwandlung des Knorpel- oder Hautparenchyms konnte nicht nachgewiesen werden.

### 4.5.1 Knorpel

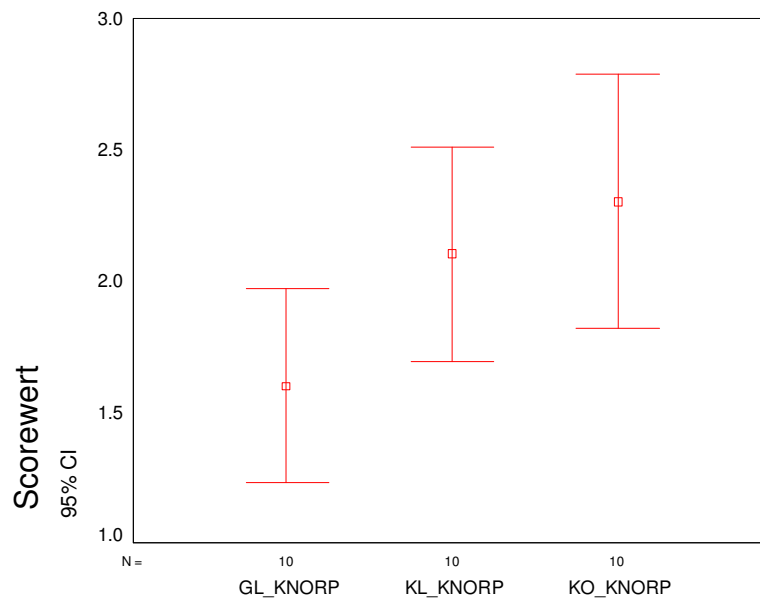


Abbildung 57: Histologie, Gruppenvergleich Knorpelzustand.

In der Kategorie Knorpelzustand erreichte die Knorpelgruppe GL einen Scorewert von durchschnittlich  $1,6 \pm 0,52$ , bei einem Minimum von 1 und einem Maximum von 2.

Die Knorpelgruppe KL wies einen Scorewert von durchschnittlich  $2,1 \pm 0,57$ , bei einem Minimum von 1 und einem Maximum von 3.

Die Knorpelgruppe KO erzielte einen Scorewert von durchschnittlich  $2,3 \pm 0,67$ , bei einem Minimum von 1 und einem Maximum von 3.

Im zusammenfassenden Gruppenvergleich zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Gruppenvergleich GL und der Kontrollgruppe KO ( $p= 0,031$ ).

Die histologische Beurteilung der Knorpelvitalität wies in der Knorpelgruppe GL eine signifikant höhere Knorpelvitalität auf als in der Kontrollknorpelgruppe KO.

Die Knorpelgruppe GL wies eine geringfügig verbesserte Knorpelvitalität im Vergleich zur Knorpelgruppe KL auf.

Die Knorpelgruppe KL wies ebenso eine verbesserte Knorpelvitalität gegenüber der Kontrollgruppe KO auf.

Die Gruppenvergleiche GL und KL sowie KL und KO ergaben jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Kategorie Knorpelzustand.

### 4.5.2 Perichondrium

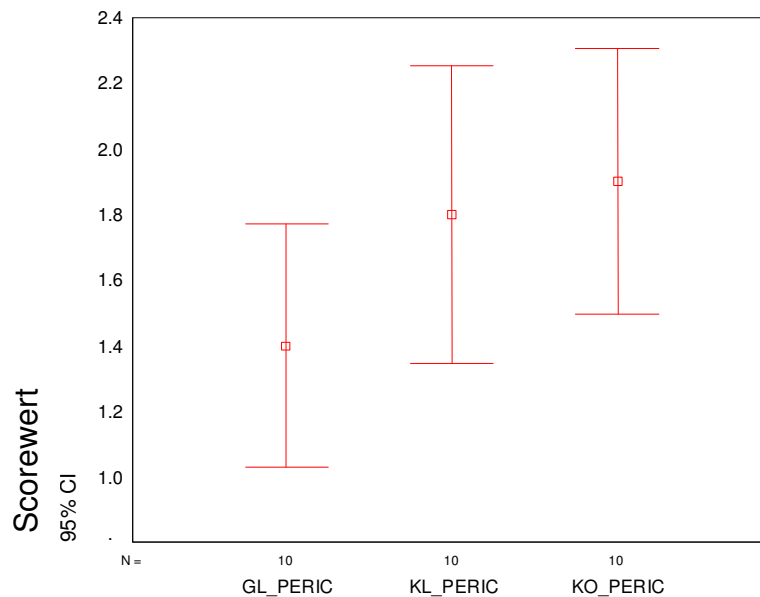


Abbildung 58: Histologie, Gruppenvergleich Perichondriumzustand.

In der Kategorie Perichondrium erreichte die Knorpelgruppe GL einen Scorewert von durchschnittlich  $1,4 \pm 0,52$ , bei einem Minimum von 1 und einem Maximum von 2.

Die Knorpelgruppe KL wies einen Scorewert von durchschnittlich  $1,8 \pm 0,63$ , bei einem Minimum von 1 und einem Maximum von 3.

Die Knorpelgruppe KO erzielte einen Scorewert von durchschnittlich  $1,9 \pm 0,57$ , bei einem Minimum von 1 und einem Maximum von 3.

In der Kategorie Perichondriumzustand ergab sich kein signifikanter Unterschied im Gruppenvergleich GL und KO, KL und KO sowie GL und KL.

Die Vitalität des Perichondriums war in der histologischen Beurteilung geringfügig besser als in der Knorpelgruppe KL und KO.

Die Präparation der Knorpelgruppe GL führte jedoch zu keiner signifikant verbesserten Vitalität des Perichondriums im Vergleich zur Präparationsmethode der Knorpelgruppe KL und zur Knorpelkontrollgruppe KO.

Die Knorpelgruppe KL unterschied sich hinsichtlich der Kategorie Perichondriumzustand nicht von der Kontrollgruppe KO.

### 4.5.3 Hautoberfläche

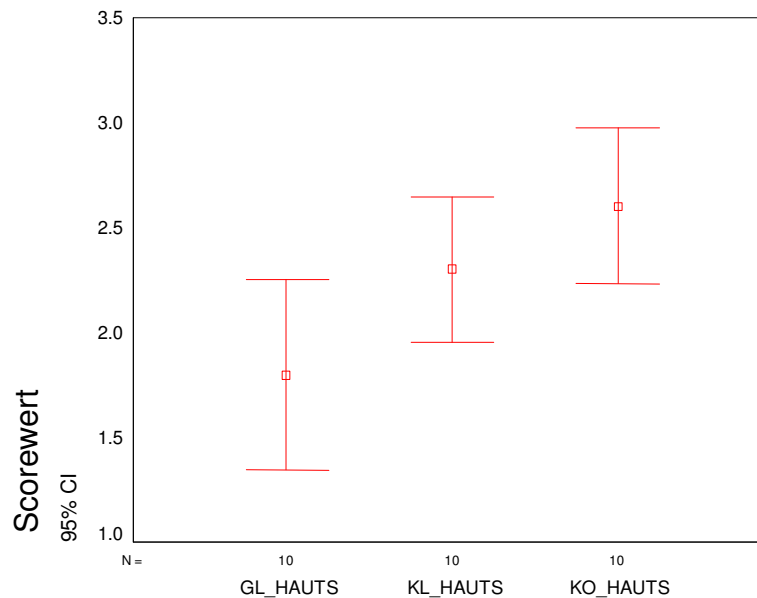


Abbildung 59: Histologie, Gruppenvergleich Hautoberfläche.

In der Kategorie Hautoberfläche erreichte die Knorpelgruppe GL einen Scorewert von durchschnittlich  $1,8 \pm 0,63$ , bei einem Minimum von 1 und einem Maximum von 3.

Die Knorpelgruppe KL wies einen Scorewert von durchschnittlich  $2,3 \pm 0,48$ , bei einem Minimum von 2 und einem Maximum von 3.

Die Knorpelgruppe KO erzielte einen Scorewert von durchschnittlich  $2,6 \pm 0,52$ , bei einem Minimum von 2 und einem Maximum von 3.

Die Vitalität der Hautoberfläche der Knorpelgruppe GL war geringfügig besser als in der Knorpelgruppe KL und ebenso im Vergleich zur Kontrolle KO.

Die Knorpelgruppe KL wies gegenüber der Kontrollknorpelgruppe eine geringfügig Verbesserung in der Kategorie Hautoberfläche auf.

Es ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der Kategorie Hautoberfläche im Gruppenvergleich GL und KL, GL und KO sowie KL und KO.

## 4.5.4 Subcutis

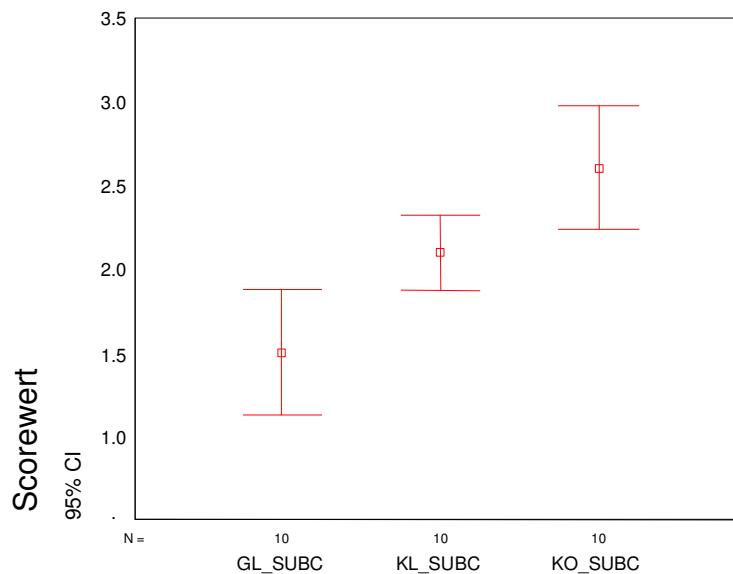


Abbildung 60: Histologie, Gruppenvergleich Subcutis.

In der Kategorie Subcutis erreichte die Knorpelgruppe GL einen Scorewert von durchschnittlich  $1,5 \pm 0,53$ , bei einem Minimum von 1 und einem Maximum von 2.

Die Knorpelgruppe KL wies einen Scorewert von durchschnittlich  $2,1 \pm 0,32$ , bei einem Minimum von 2 und einem Maximum von 3.

Die Knorpelgruppe KO erzielte einen Scorewert von durchschnittlich  $2,6 \pm 0,52$ , bei einem Minimum von 2 und einem Maximum von 3.

In der Kategorie Subcutis ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Knorpelgruppe GL und der Knorpelgruppe KL ( $p = 0,031$ ).

Die histologische Beurteilung der Subcutis wies eine signifikant verbesserte Struktur der Subcutis in der Knorpelgruppe GL verglichen mit der Knorpelgruppe KL auf.

Ebenso zeigte sich eine signifikant verbesserter Zustand der Subcutis in der Knorpelgruppe GL im Vergleich zur Kontrollgruppe KO ( $p = 0,004$ ).

Die Knorpelgruppe KL wies im Vergleich zur Kontrollgruppe KO eine geringfügig verbesserte histomorphologische Struktur der Subcutis auf, jedoch ergab sich in diesem Gruppenvergleich kein signifikanter Unterschied.

### 4.5.5 Haarfollikel

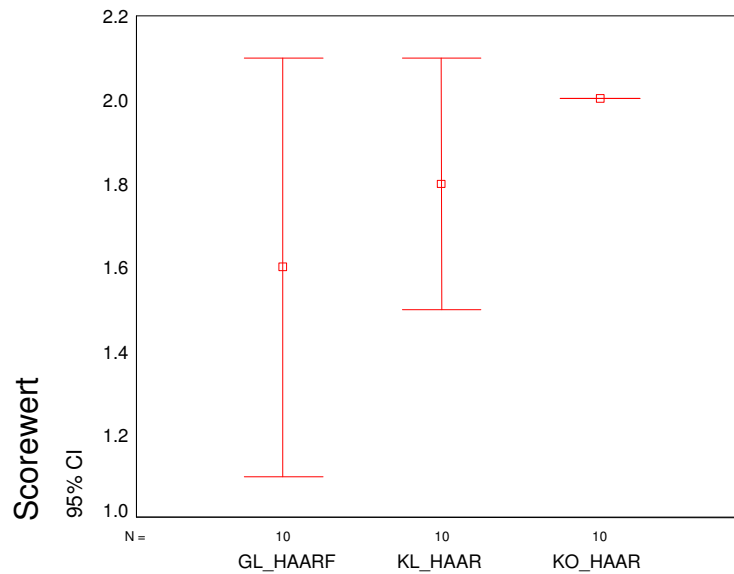


Abbildung 61: Histologie, Gruppenvergleich Haarfollikel.

In der Kategorie Haarfollikel erreichte die Knorpelgruppe GL einen Scorewert von durchschnittlich  $1,6 \pm 0,70$ , bei einem Minimum von 1 und einem Maximum von 3.

Die Knorpelgruppe KL wies einen Scorewert von durchschnittlich  $1,8 \pm 0,42$ , bei einem Minimum von 1 und einem Maximum von 2.

Die Knorpelgruppe KO erzielte einen Scorewert von durchschnittlich  $2,0 \pm 0,0$ , bei einem Minimum von 2 und einem Maximum von 2.

Es ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Kategorie Haarfollikel im Gruppenvergleich GL und KL, GL und KO sowie KL und KO.

### 4.5.6 Hautanhangsdrüsen

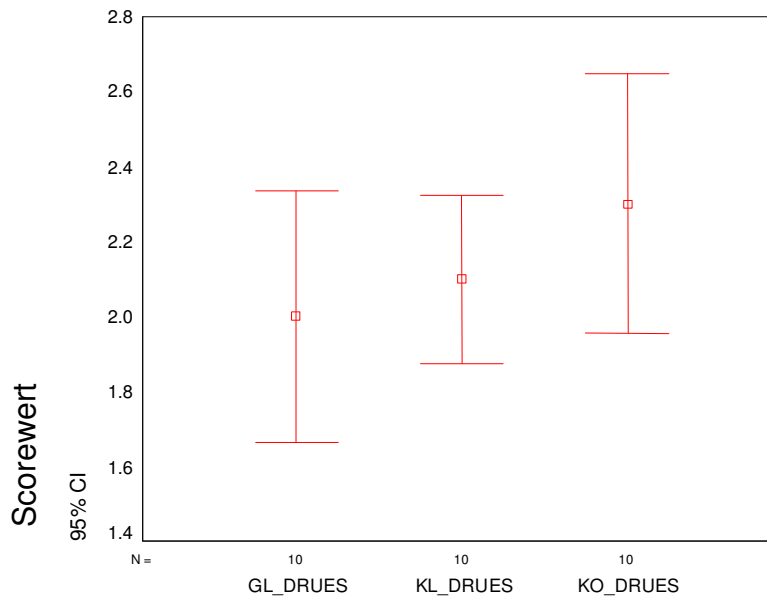


Abbildung 62: Histologie, Gruppenvergleich Drüsen.

In der Kategorie Drüsen erreichte die Knorpelgruppe GL einen Scorewert von durchschnittlich  $2,0 \pm 0,47$ , bei einem Minimum von 1 und einem Maximum von 3.

Die Knorpelgruppe KL wies einen Scorewert von durchschnittlich  $2,1 \pm 0,32$ , bei einem Minimum von 2 und einem Maximum von 3.

Die Knorpelgruppe KO erzielte einen Scorewert von durchschnittlich  $2,3 \pm 0,48$ , bei einem Minimum von 2 und einem Maximum von 3.

Die Ausprägung der Drüsen in der Knorpelgruppe GL war geringfügig höher als in der Kontrollknorpelgruppe KO.

Die Knorpelgruppe KL wies gegenüber der Kontrollknorpelgruppe ebenso eine geringfügig Verbesserung in der Kategorie Drüsen auf.

Es ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der Kategorie Drüsen im Gruppenvergleich GL und KL, GL und KO sowie KL und KO.

### 4.5.7 Dermale Gefäße

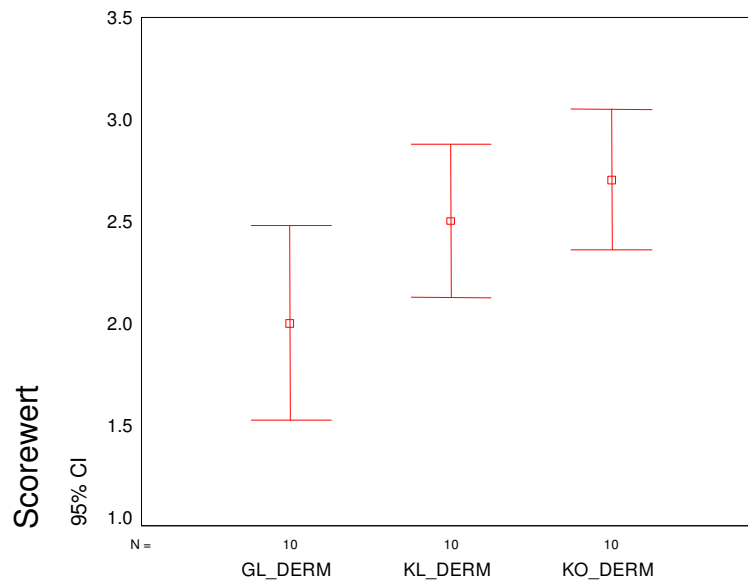


Abbildung 63: Histologie, Gruppenvergleich dermale Gefäße.

In der Kategorie dermale Gefäße erreichte die Knorpelgruppe GL einen Scorewert von durchschnittlich  $2,0 \pm 0,67$ , bei einem Minimum von 1 und einem Maximum von 3.

Die Knorpelgruppe KL wies einen Scorewert von durchschnittlich  $2,5 \pm 0,53$ , bei einem Minimum von 2 und einem Maximum von 3.

Die Knorpelgruppe KO erzielte einen Scorewert von durchschnittlich  $2,7 \pm 0,48$ , bei einem Minimum von 2 und einem Maximum von 3.

Im zusammenfassenden Gruppenvergleich zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Gruppenvergleich GL und der Kontrollgruppe KO ( $p=0,031$ ).

Die histologische Beurteilung der Ausprägung der dermalen Gefäße wies in der Knorpelgruppe GL einen signifikant höheren Anteil an dermalen Gefäßen auf als in der Kontrollknorpelgruppe KO.

Die Knorpelgruppe GL wies einen geringfügig höheren Anteil dermalen Gefäße auf im Vergleich zur Knorpelgruppe KL und zur Kontrollknorpelgruppe KO.

In der Kategorie dermale Gefäße unterschied sich die Knorpelgruppe KL nicht von der Kontrollgruppe KO.



### 4.5.8 Knorpel allgemein

Im Folgenden wurden die Kategorie Knorpelzustand und Perichondrium zur Ausprägung Knorpel allgemein KN\_S zusammengefasst und im Gruppenvergleich dargestellt.

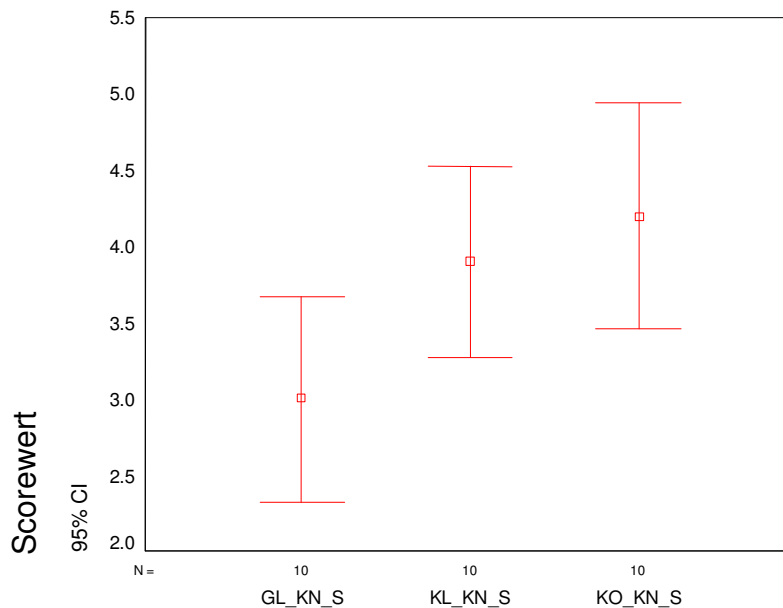


Abbildung 64: Histologie, Gruppenvergleich Knorpel allgemein.

In der Kategorie Knorpel allgemein erreichte die Knorpelgruppe GL einen Scorewert von durchschnittlich  $3,0 \pm 0,94$ , bei einem Minimum von 2 und einem Maximum von 4. Die Knorpelgruppe KL wies einen Scorewert von durchschnittlich  $3,9 \pm 0,87$ , bei einem Minimum von 3 und einem Maximum von 5.

Die Knorpelgruppe KO erzielte einen Scorewert von durchschnittlich  $4,2 \pm 1,03$ , bei einem Minimum von 2 und einem Maximum von 6.

Im zusammenfassenden Gruppenvergleich zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Gruppenvergleich GL und der Kontrollgruppe KO ( $p= 0,016$ ).

Die zusammenfassende Beurteilung Knorpel allgemein wies in der Knorpelgruppe GL eine signifikant höhere Knorpelvitalität auf als in der Kontrollknorpelgruppe KO und der Knorpelgruppe KL. Die Knorpelgruppe KL wies eine geringfügig verbesserte Knorpelvitalität gegenüber der Kontrollgruppe KO auf.

Die Gruppenvergleiche GL und KL sowie KL und KO ergaben jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Kategorie Knorpel allgemein.

#### 4.5.9 Haut allgemein

Ebenso wurden die Kategorien Hautoberfläche, Subcutis, Haarfollikel, Drüsen und dermale Gefäße zu dem Parameter Haut allgemein subsummiert und im Gruppenvergleich im Folgenden dargestellt.

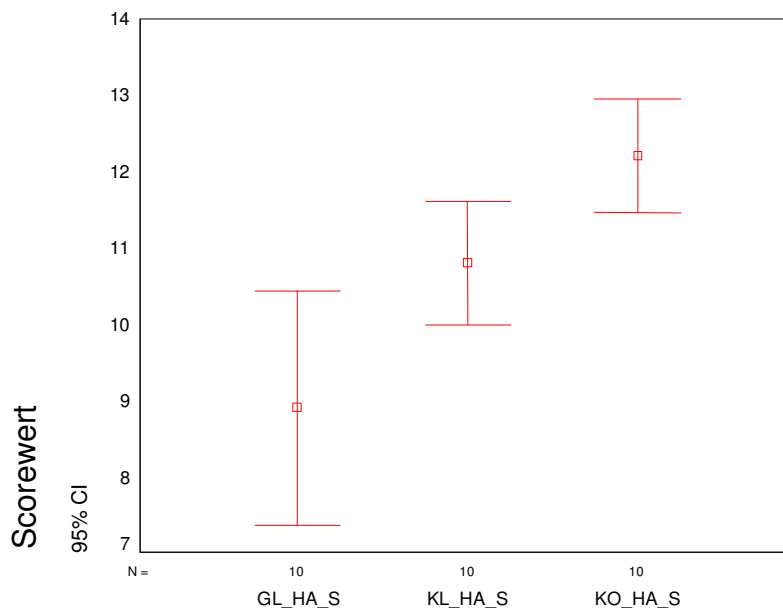


Abbildung 65: Histologie, Gruppenvergleich Haut allgemein.

In der Zusammenfassung Haut allgemein erreichte die Knorpelgruppe GL einen Scorewert von durchschnittlich  $8,9 \pm 2,13$ , bei einem Minimum von 7 und einem Maximum von 14. Die Knorpelgruppe KL wies einen Scorewert von durchschnittlich  $10,8 \pm 1,13$ , bei einem Minimum von 9 und einem Maximum von 13.

Die Knorpelgruppe KO erzielte einen Scorewert von durchschnittlich  $12,2 \pm 1,03$ , bei einem Minimum von 11 und einem Maximum von 14.

Im zusammenfassenden Gruppenvergleich zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Gruppenvergleich GL und der Kontrollgruppe KO ( $p= 0,012$ ).

Die zusammenfassende Beurteilung Haut allgemein wies in der Knorpelgruppe GL eine signifikant höhere Hautvitalität auf als in der Kontrollknorpelgruppe KO.

Die Knorpelgruppe GL wies eine geringfügig verbesserte Hautvitalität im Vergleich zur Knorpelgruppe KL auf, jedoch ohne signifikanten Unterschied.

Die Knorpelgruppe KL wies eine signifikant höhere Hautvitalität gegenüber der Kontrollgruppe KO auf ( $p=0,039$ ).

#### 4.5.10 Gefäße im Stanzbereich

Das Vorhandensein von Gefäßen im Stanzbereich wurde im Gruppenvergleich GL und KL dargestellt.

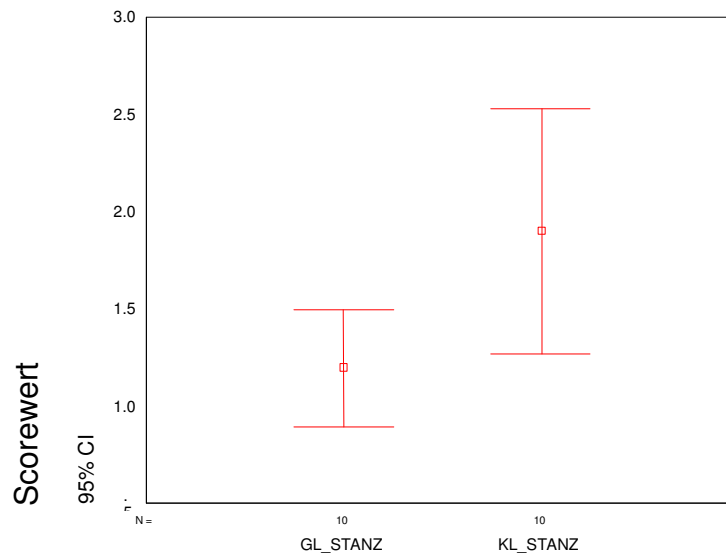


Abbildung 66: Histologie, Gruppenvergleich Gefäße im Stanzbereich.

In der Kategorie der Gefäße im Stanzbereich erreichte die Knorpelgruppe GL einen Scorewert von durchschnittlich  $1,2 \pm 0,42$ , bei einem Minimum von 1 und einem Maximum von 2.

Die Knorpelgruppe KL wies einen Scorewert von durchschnittlich  $1,9 \pm 0,88$ , bei einem Minimum von 1 und einem Maximum von 3.

Im Gruppenvergleich wies die Knorpelgruppe GL signifikant häufiger Gefäße im Stanzbereich auf als die Knorpelgruppe KL ( $p=0,031$ ).

### 4.5.11 Positionsvergleich

Im Positionsvergleich von Knorpel allgemein Kn\_S und den darin zusammengefaßten Parametern für jeweils alle 3 Gruppen konnte ein Einfluß der Lokalisation auf das histologische Resultat wie bereits in den vorangegangenen Auswertungen ausgeschlossen werden.

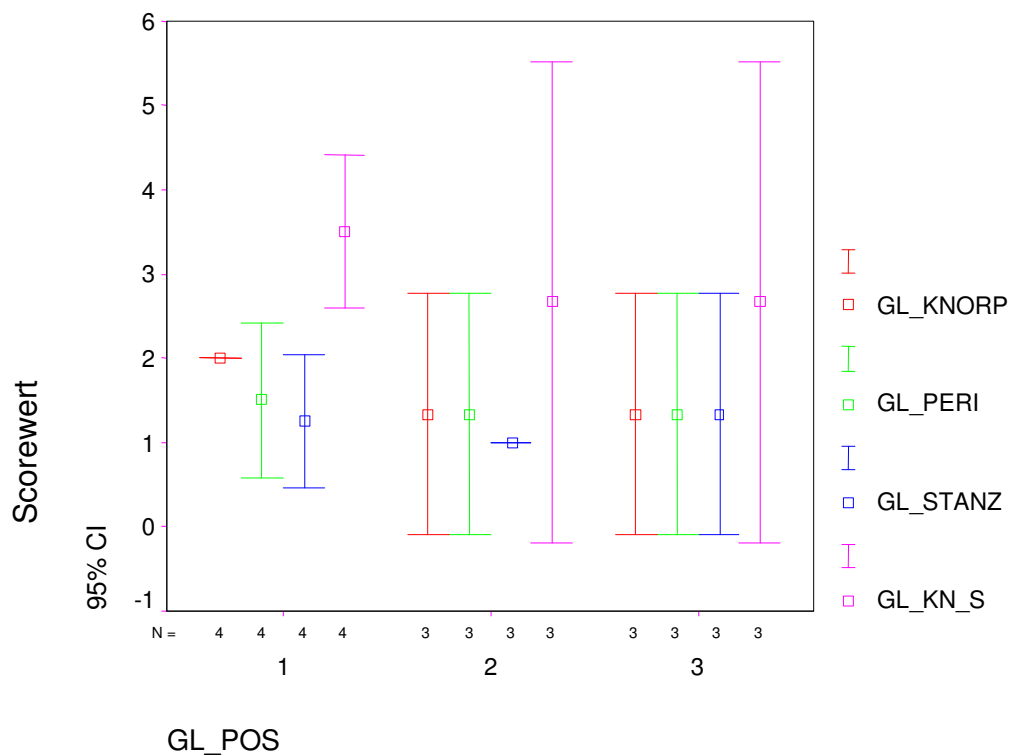


Abbildung 67: Histologie, Knorpel, Positionsvergleich GL.

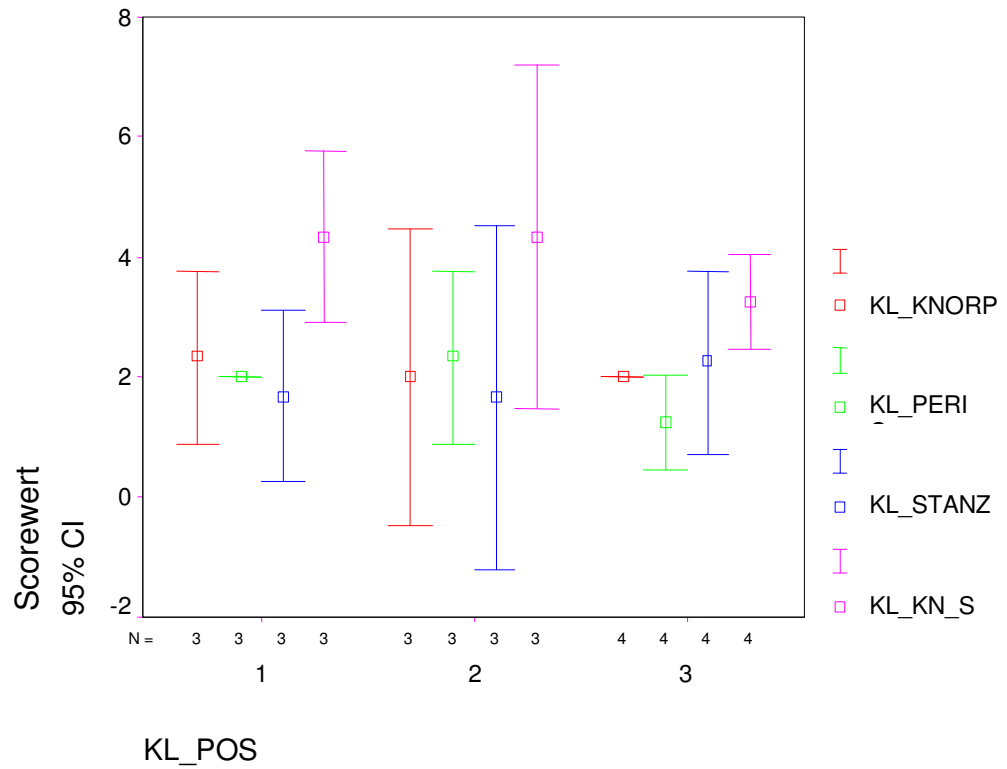


Abbildung 68: Histologie, Knorpel, Positionsvergleich KL.

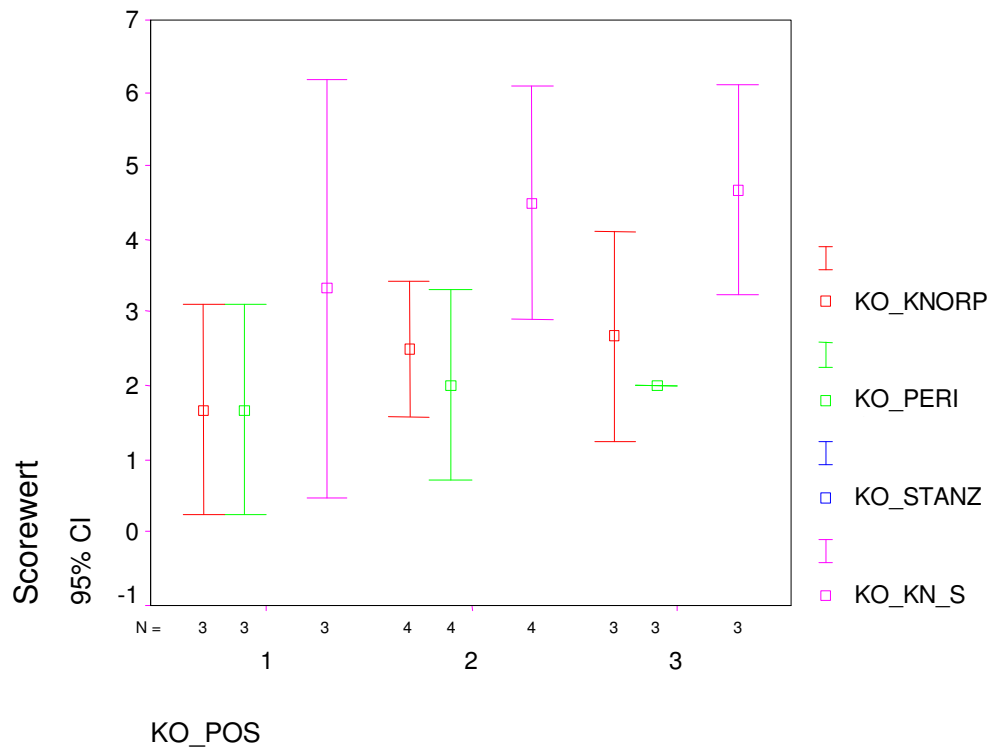


Abbildung 69: Histologie, Knorpel, Positionsvergleich KO

Die Unabhängigkeit der histologischen Ergebnisse von der Implantationsreihenfolge der Knorpelpräparate wurde auch für Haut allgemein Ha\_S und den darunter aufgelisteten Parametern bei allen 3 Gruppen nachgewiesen.

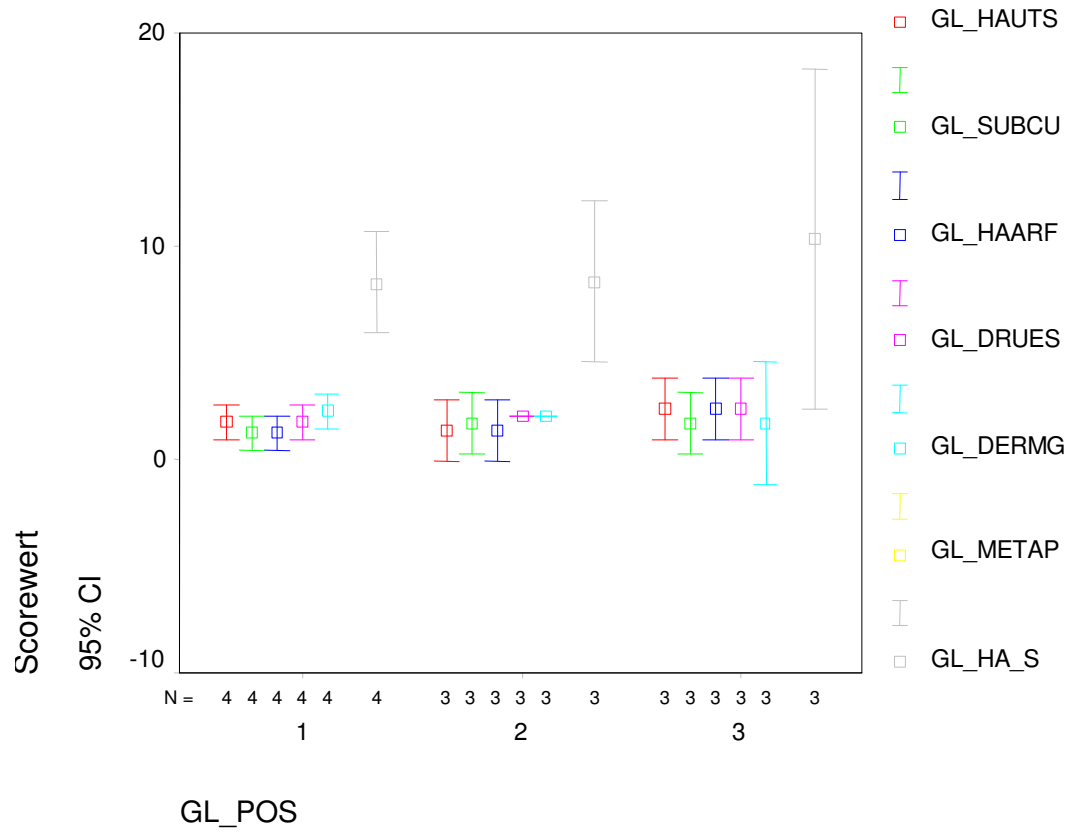


Abbildung 70: Histologie, Haut, Positionsvergleich, GL.

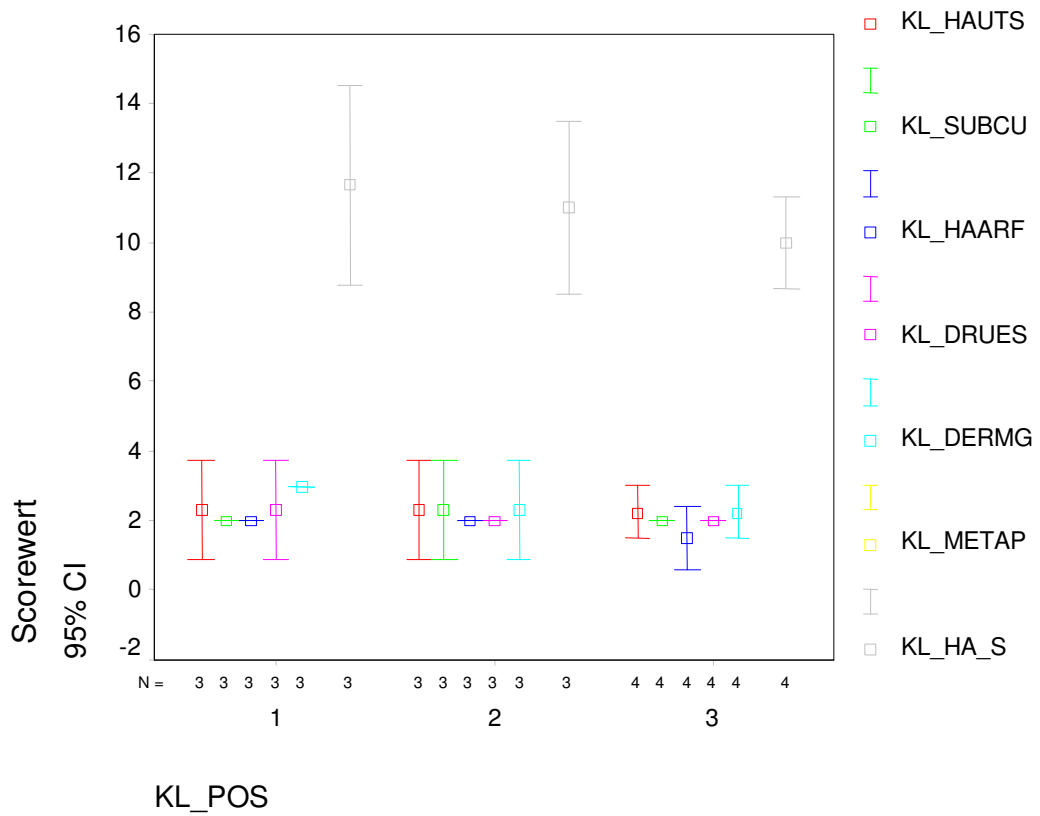


Abbildung 71: Histologie, Haut, Positionsvergleich, KL.

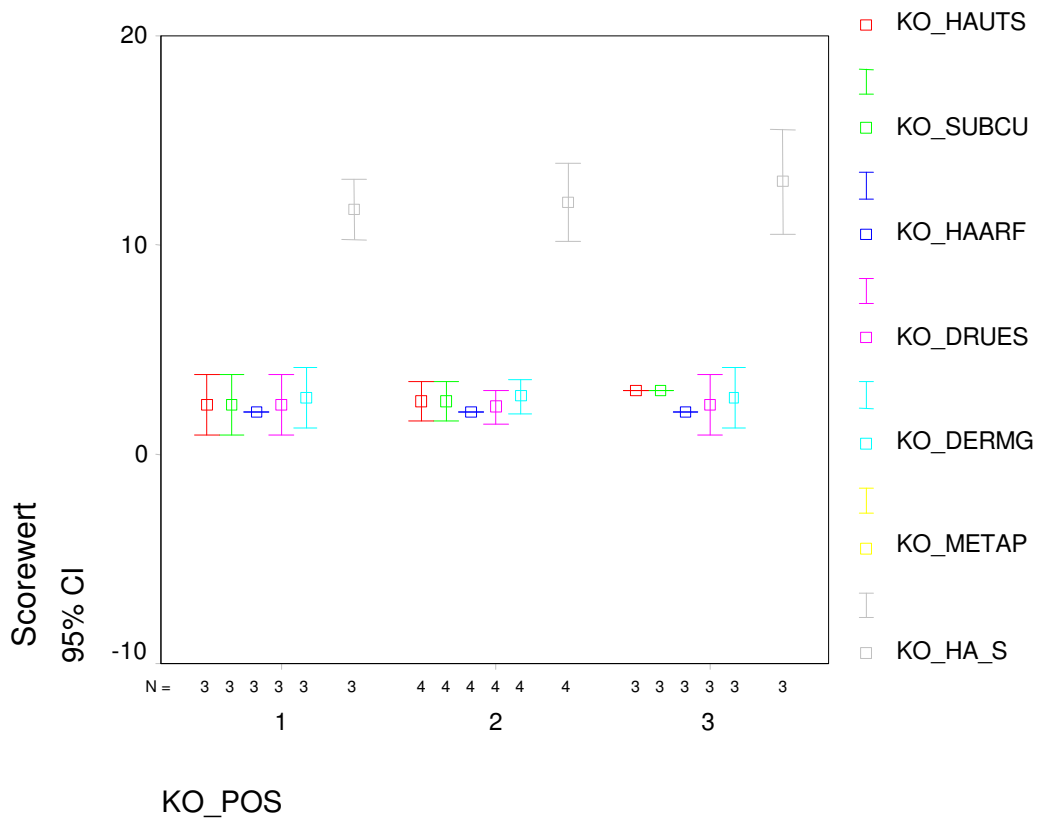


Abbildung 72: Histologie, Haut, Positionsvergleich, KO.

## 4.6 Immunhistologie

Nach der in Kap. 3.9.5 beschriebenen immunhistochemischen Methode wurden die chondrokutanen Lappen von zwei Tieren immunhistochemisch evaluiert und nach dem in Kap. 3.9.5.2 dargestelltem semiquantitativen Score ausgewertet.

Die Resultate werden in folgender Tabelle aufgelistet:

Tiernr.	Methode pos./ neg.	Lokalisation Endothel – Färbenachweis	Anzahl nachgewiesener Gefäße	
			Perichondrium	Stanzung
GL				
37	pos	+++	++	+++
93	pos	+++	+++	++
KL				
37	pos	++	++	+
93	pos	++	+	+
Ko				
37	pos	++	++	+
93	pos	++	+	+

Tabelle 44: Immunhistochemische Auswertung für GL, KL und KO.

Da dieses Verfahren nur an zwei Tieren beispielhaft durchgeführt wurde und damit der Stichprobenumfang für eine statistische Auswertung zu gering ist, dient das immunhistochemische Verfahren zur weiteren Deskription des bearbeiteten Knorpels. Die in Tabelle 44 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass das Verfahren in den zwei Tieren mit Erfolg angewandt werden konnte und der positive Endothelnachweis in beiden Fällen als Voraussetzung für die Auswertung gegeben war.

In der Knorpelgruppe GL konnte Endothel im Stanzungsbereich in den zwei Tieren nachgewiesen werden. In der Knorpelgruppe KL war der Endothelnachweis lediglich im Bereich des Perichondriums positiv.

Insgesamt ließ sich ein positiver Endothelnachweis im Stanzbereich nur in der Gruppe GL nachweisen.



## **5 Diskussion**

### **5.1 Eignung des Tiermodells**

In der durchgeführten Studie wurden die Auswirkungen zweier verschiedener Perforationstechniken am Knorpel auf die Neovaskularisation im chondrokutanen Lappen untersucht.

Hierbei handelt es sich um eine vorklinische Studie am Tiermodell. In vergleichbaren tierexperimentellen Studien wurde zur Untersuchung chondrokutaner Gewebe ebenfalls das Kaninchenmodell gewählt [14, 19, 112, 119, 153, 157]. Die untersuchten Gewebe und deren Eigenschaften erwiesen sich im Kaninchenmodell als vergleichbar deren menschlichem Pendant.

In Zusammenschau ähnlicher durchgeführter Studien variierte die Anzahl der Versuchstiere von 8 bis 20 [14, 45, 119, 153].

Die Beobachtungsdauer des prälaminierten Knorpellappens wurde mit 8 Wochen nach Implantation im Hinblick auf Haltung, Pflege, Auslastung und Zumutbarkeit in Analogie zur internationalen Studienlage gewählt. In vergleichbaren Studien werden hierfür 6 bis 12 Wochen [14, 119, 153] angegeben.

### 5.2 Eignung des Studienaufbaus

Bisher wurden viele Vorgehensweisen untersucht, um die Neoangiogenese und damit die Vitalitätserhaltung von Knorpeltransplantaten zu optimieren. Seit den Anfängen der autologen Knorpeltransplantation wurden viele Studien publiziert, die auf die klinische Anwendung, die Vitalität und Langlebigkeit der Knorpelgrafts abzielten. Die Studien weisen eine hohe Heterogenität der erzielten Ergebnisse auf. In Abhängigkeit von der verwendeten Technik wurde von ausgedehnten Nekrosen und Resorption der Grafts berichtet [145]. Viele dieser Ansätze erwiesen sich als ungeeignet.

Angewendete Verfahren waren crushed oder kryokonservierter Knorpel. Keines dieser Verfahren erbrachte signifikante Verbesserungen oder konnte sich in der klinischen Praxis durchsetzen [119].

In der hier vorgestellten Arbeit wurde tierexperimentell ein neuer Ansatz verfolgt. Diesem liegt der Gedanke zugrunde, durch Perforation des Knorpeltransplantats das transcartilaginäre Einsprossen von Gefäßen zu fördern und damit die zu überbrückenden Diffusionswege zu verringern.

Dieser Ansatz, der den Nachteil einer verringerten Stabilität und Integrität des Transplantats birgt, erscheint vom pathophysiologischem Standpunkt sinnvoll.

Die hierbei hauptsächlich zu klärende Frage ist neben der Neovaskularisation des Transplantats die nach dem Ausmaß und der Größe der zu setzenden Perforationen. Hierbei gilt es einen Kompromiss zwischen maximaler Förderung der Neoangiogenese und der Wahrung der biomechanischen Stabilität des Transplantats zu schließen.

In vergleichbaren tierexperimentellen Studien wurde dazu ebenfalls elastischer Ohrknorpel in Portionen von 2x2cm verwandt [119].

Um unter kontrollierten Bedingungen das optimale Ausmaß der Perforation zu ermitteln erscheint das Studiendesign als zweckmäßig.

Elastischer Ohrknorpel ist hinsichtlich der Präparationstechnik und der Verfügbarkeit für die Fragestellung und den Versuchsaufbau besonders günstig. Auch im Hinblick auf den klinischen Einsatz im Bereich der plastisch-rekonstruktiven Chirurgie stellt

elastisches Knorpelparenchym ein ideales Transplantatmaterial im Vergleich zur Vielzahl der alloplastischen Materialien dar [26, 33, 34].

Unter diesen ist Silikon neben Hydroxyapatit, Mersilene meshes, Polyethylen, Polyamid meshes, Akryl, Silastik und Polytetrafluoroethylen das in der plastisch - rekonstruktiven Chirurgie am häufigsten verwendete Material [5, 52, 85, 87, 95, 107, 109, 122, 140, 146].

Es wurde ein zweizeitiges Vorgehen gewählt. In erster Sitzung erfolgte die Entnahme, Bearbeitung und heterotope Implantation des autologen Knorpels. In zweiter Sitzung erfolgte die Transplantation von Vollhaut auf den in erster Sitzung transplantierten Knorpel.

Dieses Vorgehen verfolgt zwei Grundgedanken:

1. Um eine kontrollierte basale Gefäßeinsprossung zu ermöglichen, wurde die über dem Transplantat liegende native Haut in zweiter Sitzung entfernt. Hierdurch wird versucht, die Neovaskularisation des Transplantats ausschließlich durch den darunterliegenden Gefäßstiel (A. epigastrica superficialis) zu erzielen.
2. Eher als Nebeneffekt einzustufen ist das avaskuläre Vollhauttransplantat als primärer klinischer Indikator für die erfolgreiche Revaskularisation des darunterliegenden Knorpellayers.

Das zweizeitige Vorgehen wurde gewählt, da bei einzeitigem Vorgehen die Versorgung des Vollhauttransplantats durch den primär avaskulären Knorpellayer hindurch nicht gewährleistet wäre.

Die vierwöchige Latenz der beiden Eingriffe erscheint in pathophysiologischer Sicht sinnvoll, da nach dieser Frist von einer suffizienten Kapillaraussprossung im Heilungsverlauf ausgegangen werden kann [22, 121, 127, 129].

Zur Beurteilung der Vaskularisation des Transplantats wurden direkte und indirekte Evaluationsverfahren angewendet.

Der direkte Nachweis erfolgte durch die klassischen Verfahren der Angiographie und Histologie.

Als neuartiges Verfahren, das aufgrund mangelnder Verfügbarkeit in unserer Studie nur an zwei Fällen herangezogen wurde, kam ein immunhistochemischer Endothelzellnachweis zur Anwendung.

Indirekte Verfahren, die Rückschlüsse auf die Vitalität des Knorpeltransplantats ermöglichen, waren die Planimetrie und die klinische Vitalitätsbeurteilung des Knorpels und der Vollhaut.

## 5.3 Untersuchungsmethoden

### 5.3.1 Angiographie

Zur angiographischen Untersuchung von bereits vorhandenen oder neugebildeten Gefäßen wird im Rahmen von Tiermodellen und vergleichbaren Fragestellungen die Angiographie mit reinem oder verdünntem, gefiltertem Bariumsulfat als Kontrastmittel unter konstantem, physiologischem Infusionsdruck angewandt [124].

Optional wird eine abschließende formaldehydhaltige Bariumsulfatperfusion empfohlen [35, 111]. Um eine exakte Abbildung der Neovaskularisation zu erhalten werden alternative Darstellungsmodi und Messverfahren beschrieben.

Debbage et al. (1998) verwendeten eine intravitale Lektinperfusion am Mausmodell mit elektronenmikroskopischer und magnetresonanztomographischer Auswertung zur Unterscheidung effektiver und ineffektiver Mikroperfusion im Tumorgebiet [29].

Tark et al. (1996) evaluierten die Technik der Fluormetrie zur Messung der Perfusion von abdominalen Hautlappen an Ratten, nachdem verschiedene Gefäßträger implantiert worden waren. Dabei wurde 1,5 mg/kg KG Natriumfluoreszein in die V. jugularis externa injiziert. Nach 30 min wurde die Hautfläche über Fluoroscans gemessen. Trotz nahezu 100% Überlebensraten der Hautlappen erreicht die Fluoreszeinmethode bestenfalls Werte von 54% [136].

Zur Darstellung der Gefäße im Untersuchungsareal wählte man in diesem Modell die angiographische Methode mit Bariumsulfatperfusion unter physiologischem Druck.

Bei keinem Tier ergab sich angiographisch der Verdacht einer Thrombosierung oder Gefäßobliteration der A. epigastrica superficialis.

Bei der statistischen Auswertung der Angiographie wurde stets die permutierte Reihenfolge der Knorpelquadrate bezüglich des Implantationsorts berücksichtigt.

### 5.3.1.1 Quantitative Auswertung

Die anhand des Friedman Tests untersuchten Ergebnisse lassen keine statistisch signifikante Zu- oder Abnahme der Gefäßschnittpunkt-anzahl im Verlauf der von kaudal nach kranial zu liegen kommenden Schnittlinien innerhalb eines Knorpelquadrats erkennen.

Es wurde der Einfluss der Position 1/2/3 entsprechend kaudal/ mittig/ kranial der einzelnen Knorpelimplantate auf die quantitativ angiographisch ermittelten Ergebnisse untersucht.

Damit konnte gezeigt werden, dass die angiographischen Ergebnisse von der Implanationsposition kranial, mittig oder kaudal weitgehend unbeeinflusst und davon unabhängig zu betrachten sind.

Auf eine Ermittlung der exakten Signifikanz wurde damit verzichtet.

Der wesentliche Versuchsaspekt der quantitativ angiographischen Auswertung stellt die Auswertung der Unterschiede bezüglich Neovaskularisation in den zwei Untersuchungsgruppen GL und KL verglichen mit der Kontrollgruppe KO nach achtwöchiger Einheilungsphase dar.

Daraus ergibt sich für den Gruppenvergleich zwischen der nativen Kontrollgruppe und der Gruppe GL ein signifikanter Unterschied. Im Mittel wurden in der Knorpelvariante GL mit den 4mm messenden Stanzungen somit angiographisch signifikant mehr Gefäßschnittpunkte ermittelt als in der Kontrollgruppe KO. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen KL/ KO und KL/ GL.

Abschließend wurde die Fragestellung der effektiven Neovaskularisation im Vergleich zur iatrogen induzierten Granulationsgewebepildung evaluiert.

Dabei wurde davon ausgegangen, dass die Differenz an Gefäßschnittpunkten zwischen der Kontrollgruppe KO und dem kontralateralen Vergleichshautlappen einer Granulations- und Fibrosereaktion entspricht.

Diese operativ bedingten Umbauvorgänge wurden jeweils von der Summe der Gefäßschnittpunkte der Gruppe GL und KL subtrahiert, um zu der effektiven, im

Bereich der Stanzung befindlichen Neokapillarisation in der Gruppe GL und KL zu gelangen und statistisch ausgewertet.

Es ergab sich somit abschließend nach Bereinigung der Ergebnisse und Subtraktion der operationsbedingten Granulationsprozesse kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen GL und KL in der Kategorie der effektiven, angiographisch nachweisbaren Kapillarisation.

### 5.3.1.2. Qualitative Auswertung

Im Folgenden werden die Gruppen GL, KL und die Kontrollgruppe KO nach angiographisch arterieller und venöser Auswertung und dabei wiederum nach der Lumengröße des Gefäßes (A entsprechend A. bzw. V. epigastrica superficialis, B entsprechend Gefäßen 1. Abgangs, C entsprechend dem Kapillaräquivalent) unterschieden. Die Darstellung erfolgte unter Berücksichtigung der Gefäßversorgung im nativen kontralateralen Hautlappen.

Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen in der arteriellen Auswertung in der Gefäßkaliberklassen A und B.

In der Größenklasse C der arteriellen Auswertung wurde das Ergebnis mit Hilfe des Wilcoxon Tests im Gruppenvergleich GL/ KL, GL/ KO und KL/ KO weiter aufgeschlüsselt.

Dabei ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen GL und KO in der arteriellen Auswertung im Gefäßkaliber C. Die Gruppe GL weist im Vergleich zur Kontrollknorpelgruppe signifikant mehr arterielle Gefäße auf Kapillarebene auf.

Die Auswertung für das venöse Gefäßsystem wurde analog durchgeführt.

Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen in der venösen Auswertung in der Gefäßkaliberklassen A und B. Der signifikante Unterschied 0,00 der drei Gruppen in der Größenklasse C, die das Kapillaräquivalent darstellt, wurde mit Hilfe des Wilcoxon Tests im Gruppenvergleich GL/ KL, GL/ KO und KL/ KO weiter aufgeschlüsselt.

Daraus ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen allen Gruppen GL, KL und KO untereinander in der venösen Auswertung im Gefäßkaliber C. Die Gruppe GL weist im Vergleich zu Gruppe KL und zur Kontrollknorpelgruppe KO signifikant mehr venöse Gefäße auf Kapillarebene auf. Ebenso weist auch die Knorpelgruppe KL im Vergleich zur Kontrollknorpelgruppe KO signifikant mehr venöse Gefäße auf Kapillarebene auf.

Die Angiogenese auf Kapillarebene als Reaktion auf die lokale Ischämie in Knorpel- und Vollhautgewebe nach Transplantation ließ sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Folkman et al. (1982) [36], Morrison et al. (1990) [88], Park et al.



(1996) [105] und Stepan et al. (1993) [130] nachweisen. Es wird postuliert, dass es als Folge eines angiogenen Stimulus wie der posttransplantatorischen Gewebeischämie im Bereich des Knorpeltransplantats im Rahmen des ersten Eingriffs und des Vollhauttransplantats im zweiten Eingriff ausgehend vom bestehenden Gefäßbett zur lokalen Freisetzung von angiogenen Faktoren aus dem Gefäßbett und schließlich zur kapillären Gefäßausprossung in den perivaskulären Raum kommt.

Diese von der Arteria und Vena epigastrica superficialis ausgehende kapilläre Neoangiogenese konnte man in diesem Versuchsvorhaben entsprechend Nguyen et al. (2004) [96] und Stepan et al. (1993) [130] bereits nach einem Zeitintervall von 8 Wochen angiographisch nachweisen.

Um die Unterschiede deutlicher auszuarbeiten, wurde innerhalb einer jeden Gruppe GL, KL und KO das Gefäßkaliber C jeweils in arterieller und venöser Auswertung dargestellt.

In keiner Gruppe zeichnete sich ein deutlicher Unterschied in der Anzahl der Gefäße in der Gefäßgröße C im direkten Vergleich arterielles versus venöses Gefäßsystem ab.

### 5.3.2 Planimetrie

Mit dem planimetrischen Auswertungsverfahren sollte gezeigt werden, dass die Schrumpfungstendenz bzw. die ischämische Involution des Vollhauttransplantats auf der Knorpelvariante GL bzw. KL durch verbesserte, transcartilaginäre Vaskularisation geringer ausfällt als in der Kontrollgruppe KO.

Auch bei dieser Auswertungsmethode wurde ein möglicher Einfluss der Position 1/2/3 entsprechend kaudal, Mitte, kranial berücksichtigt. Es ließ sich statistisch kein Einfluss des Implantationsorts auf die planimetrischen Ergebnisse nachweisen.

Im Gruppenvergleich ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen GL und KO, es lagen keine statistisch relevanten Unterschiede in den anderen Gruppenvergleichen vor. Zusammenfassend ist eine Tendenz hinsichtlich höhergradiger Hautflächenerhaltung in der Gruppe GL verglichen mit der Kontrollgruppe zu erkennen.

Entsprechend der Ergebnisse von Converse et al. (1950) [24] und Mc Laughlin et al. (1955) [86] neigen nichtvaskularisierte Gewebegrfts zu starker Schrumpfung. Holle et al. (1994) [57] zeigte, dass das Einheilen, der Funktionszustand, die Vitalität und der langfristige Erhalt der Fläche von Vollhauttransplantaten mit der Gefäßversorgung des Empfängerbetts zum Zeitpunkt der Transplantation in Zusammenhang steht. Durch die Auswahl oder die Präfabrikation eines Empfängerbetts mit ausreichender arteriovenöser Gefäßversorgung konnte die Ischämiezeit des Grafts nach Transplantation reduziert werden und ein günstigeres Einheilen sowie eine geringere Schrumpfungstendenz des Vollhautgewebes nachgewiesen werden [57, 130].

In der vorliegenden Arbeit wies die Gruppe GL tendenziell einen höheren angiographisch nachweisbaren Gefäßanteil (siehe Kapitel 4.3.1) auf Kapillarebene (siehe Kapitel 4.3.2) im Vergleich zu KO auf. Die Postulate für eine ideales Überleben des Vollhauttransplantats zu Grunde legend [57, 130], konnte als klinischer Indikator für das Vorliegen einer funktionell optimierten Gefäßversorgung in der Gruppe GL zum Zeitpunkt der Vollhauttransplantation nach vier Wochen auch der planimetrische Nachweis einer geringeren Schrumpfungstendenz in der Gruppe GL im Vergleich zu KO geführt werden.

### **5.3.3 Histologie**

Der chondrocutane Lappen wurde, wie in Kapitel 3.9.4 beschrieben, histologisch hinsichtlich Knorpelzustand, Morphologie von Subcutis und dermalen Gefäßen, Perichondriumzustand, Hautoberfläche, Vorhandensein von Haarfollikeln und Drüsen sowie Gefäßendothel im Stanzbereich untersucht.

Bei der Auswertung der histologischen Daten setzte man sich mit einem bekannten Problem der Histopathologie auseinander.

Die quantitative Auswertung histopathologischer Befunde ist unpräzise und stellt lediglich eine Stichprobenuntersuchung des gesamten histologischen Präparats dar. Das Auszählen bestimmter endothelialer Zellen pro Flächeneinheit ist nur als Hilfsmittel bei der Befundung histologischer Schnitte anzusehen. Nach allgemeiner histopathologischer Lehrmeinung rechtfertigt dieses Vorgehen keine präzise, quantitative Auswertung histologischer Befunde. Daher wurde ein semiquantitatives Auswertungsverfahren für die Erhebung histologischer Daten herangezogen. In der histomorphologischen Auswertung wurde ein Scorevergleich zwischen den Gruppen GL, KL und der Kontrollgruppe KO in jeder Kategorie durchgeführt.

#### **5.3.3.1 Knorpelzustand**

In der Kategorie Knorpelzustand ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen GL und der Kontrollgruppe KO, in den weiteren Gruppenvergleichen ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. Die Gruppe GL weist nach dem achtwöchigen Beobachtungsintervall im Vergleich zur Kontrollgruppe histomorphologisch häufiger vitale Chondrozytenzellen auf.

#### **5.3.3.2 Perichondrium**

In der Kategorie Perichondrium ergab sich in keinem Gruppenvergleich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Vitalität der perichondrialen Zellen.

### **5.3.3.3 Cutis**

In der Kategorie Cutis ergab sich ebenfalls in keinem Gruppenvergleich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Vitalität der Cutis.

### **5.3.3.4 Subcutis**

In der Kategorie Subcutis lag ein signifikanter Unterschied zwischen GL und KL, sowie zwischen GL und der Kontrollgruppe KO vor. Zwischen KL und der Kontrollgruppe KO ergab sich kein relevanter Unterschied.

Die Gruppe GL wies im Vergleich zu der Gruppe mit kleinen Perforationen und zur Kontrollknorpelgruppe eine signifikant besser erhaltene Struktur der Subcutis nach 4wöchiger Beobachtungszeit auf.

### **5.3.3.5 Haarfollikel**

In der Kategorie Haarfollikel ergab sich in keinem Gruppenvergleich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Vorhandenseins von regelmäßig gepackten Haarfollikeln.

### **5.3.3.6 Drüsen**

In der Kategorie Drüsen ergab sich in keinem Gruppenvergleich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Vorhandenseins von Hautanhangsdrüsen.

### **5.3.3.7 Dermale Gefäße**

In der Kategorie dermale Gefäße zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe GL und der Kontrollgruppe KO. In den weiteren Gruppenvergleichen GL/ KL und KL/ KO ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Die Gruppe GL wies im Vergleich zur Kontrollknorpelgruppe signifikant häufiger dermale Gefäße auf.

Im Überblick wurden die Kategorien Knorpelzustand und Perichondrium zu Knorpel allgemein zusammengefasst und im Gruppenvergleich dargestellt.

Hierbei lässt sich in der Zusammenfassung Knorpel allgemein ein signifikanter Unterschied zwischen GL und der Kontrollgruppe KO nachweisen, in den weiteren Gruppenvergleichen ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. Die Gruppe GL wies im Vergleich zur Kontrollknorpelgruppe einen signifikant besseren allgemeinen Knorpelzustand auf.

Ebenso wurden die Kategorien Hautoberfläche, Subcutis, Haarfollikel, Drüsen und dermale Gefäße zu dem Parameter Haut allgemein zusammengefasst und im Gruppenvergleich dargestellt. Die Zusammenfassung Haut allgemein weist einen signifikanten Unterschied zwischen GL und der Kontrollgruppe KO auf, sowie zwischen KL und der Kontrollgruppe KO. Die Gruppe GL hatte im Vergleich zur Kontrollknorpelgruppe einen signifikant besseren allgemeinen Hautzustand. Ebenso wurde in der Gruppe KL im Vergleich zur Kontrollknorpelgruppe ein signifikant besserer allgemeiner Hautzustand nachgewiesen. Die Gruppen GL und KL wiesen keinen statistisch signifikanten Unterschied auf.

Das Vorhandensein von Gefäßen im Stanzbereich wurde im Gruppenvergleich GL und KL untersucht. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der Gefäßdarstellung im Stanzbereich zwischen GL und KL. Die Gruppe GL wies im Vergleich zur Gruppe mit kleinen Perforationen signifikant mehr Gefäßendothelzellen im Stanzbereich auf.

Gemäß Koshima et al. (1997) [71], Holle et al. (1994) [57] und Voy et al. (1985) [147] neigen gefäßversorgte Knorpeltransplantate mit kurzer Diffusionsstrecke zwischen Knorpelgewebe und versorgendem Kapillarnetz zu geringerer Devitalisierung und Resorption. Holle et al. (1994) [57] zeigte, dass die Vitalität von Vollhauttransplantaten mit der Gefäßversorgung des Empfängerbetts in Zusammenhang steht.

In der vorliegenden Arbeit wies die Gruppe GL tendenziell einen höheren angiographisch nachweisbaren Gefäßanteil (siehe Kapitel 4.3.1) auf Kapillarebene (siehe Kapitel 4.3.2) im Vergleich zu KO auf und einen höheren histologisch nachweisbaren Gefäßanteil im Stanzbereich (siehe Kapitel 4.5.10) im Vergleich zu KL auf. Entsprechend der Ergebnisse von Koshima et al. (1997) [71], Holle et al.

(1994) [57] und Voy et al. (1985) [147] lassen sich für die Gruppe GL in der histologischen Auswertung im Gruppenvergleich mit KL und KO günstigere Verhältnisse hinsichtlich der Knorpel- und Hautvitalität nach achtwöchiger Beobachtungsdauer nachweisen.

Der Positionsvergleich von Knorpel allgemein und Haut allgemein und den darin zusammengefassten Parametern konnte einen Einfluss der Lokalisation auf das histologische Resultat wie bereits in den vorangegangenen Auswertungen für alle drei Gruppen ausschließen.

### 5.3.4 Deskriptive Verfahren

Im Anschluss an die Gewebegewinnung wurden keine klinischen Funktionsprüfungen am Knorpel vorgenommen.

Es können daher keine quantifizierbaren Aussagen über die Druck- und Zugfestigkeit, die Elastizität und Biegsamkeit des elastischen Knorpels in den untersuchten Knorpelgruppen GL, KL und KO nach achtwöchiger Beobachtungsdauer getroffen werden.

Jedoch wird eine vergleichbare funktionelle Stabilität der Knorpelgruppen GL und KL im Vergleich zu KO angenommen, da sich weder klinisch-makroskopisch noch mikroskopisch Hinweise für eine Retraktion in den jeweiligen Stanzbereichen der Knorpelgruppen GL und KL fanden.

Zusätzlich konnte im Bereich der Perforationen der Knorpelgruppen GL und KL eine bindegewebige Durchwachsung in der achtwöchigen Beobachtungsdauer histologisch nachgewiesen werden, die eine verbesserte biomechanische Integration der Knorpelgruppen GL und KL am Implantationsort vermuten lässt.

Unter Umständen ist es auch darauf zurückzuführen, dass es in der vorliegenden Studie nicht zu den von Gibson und Davis beschriebenen Deformationen des Transplantats im postoperativen Verlauf gekommen ist [40].

### 5.3.5 Klinische Beobachtungen

Im Rahmen des zweiten Eingriffs wurde intraoperativ die Fläche und der Zustand der implantierten Knorpelgruppen GL, KL und KO nach vierwöchiger Beobachtungsdauer makroskopisch beurteilt.

Im Anschluß an die Schlußpräparation wurden die Fläche und der Zustand der Hauttransplantate nach vierwöchiger Beobachtungsphase makroskopisch beurteilt.

Im Verlauf der gesamten achtwöchigen Beobachtungsdauer wurde die Wundheilung im Bereich der Knorpelentnahmeregion klinisch beurteilt, ebenso wie die Wundheilung im Bereich der abdominalen Entnahmeregion für das Vollhauttransplantat nach dem zweiten Eingriff.

Bei keinem der 12 Tiere kam es zu einer Dislokation der Knorpel- oder Vollhauttransplantate, so dass der zweizeitig durchgeführte chondrokutane Lappen über den Beobachtungszeitraum in seinen Bestandteilen zueinander stabil blieb.

Nach Durchführung des ersten und zweiten Eingriffs konnten keine relevanten Wundheilungsstörungen im Bereich der abdominalen Wunde der 12 Tiere festgestellt werden, die zu einer Beeinflussung der angiographischen, histologischen oder planimetrischen Ergebnisse geführt hätten.

Ebenso wird der Effekt der geringgradigen, lokal begrenzten Fremdkörperreaktion an verbliebenem Fadenmaterial im Bereich der pericartilaginären, bindegewebigen Verschiebeschicht in vier Fällen auf die angiographischen, histologischen und planimetrischen Ergebnisse als geringgradig und vernachlässigbar eingestuft.

Aufgrund des zurückhaltenden und nur punktuellen Einsatzes der Elektrokoagulation zur Blutstillung im Rahmen des ersten und zweiten Eingriffs sowie während der Schlußpräparation, wird die durchgeführte Elektrokoagulation nicht als relevante Einflußgröße auf die angiographischen, histologischen und planimetrischen Ergebnisse berücksichtigt.



### **5.3.6 Immunhistochemie**

Da dieses Verfahren nur an zwei Tieren beispielhaft durchgeführt wurde und damit der Stichprobenumfang für eine statistische Auswertung zu gering ist, dient das immunhistochemische Verfahren lediglich der qualitativen Deskription des bearbeiteten Knorpels.

Die in Kapitel 4.6 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass das Verfahren in beiden Tieren mit Erfolg angewandt werden konnte und der positive Endothelzellnachweis geführt werden konnte.

In der Knorpelgruppe GL konnten Endothelzellen im Stanzungsbereich in beiden Tieren nachgewiesen werden, jedoch nicht in der Gruppe KL. In der Gruppe KL war der Endothelzellnachweis lediglich im Bereich des Perichondriums positiv.

Im Stanzungsbereich in der Knorpelgruppe GL waren die Ergebnisse in quantitativer Hinsicht uneinheitlich.

Insgesamt ließ sich ein durchwegs positiver Endothelzellnachweis im Stanzbereich in der Gruppe GL verzeichnen.

### 6 Schlussfolgerung

In der statistischen Auswertung der drei Untersuchungsverfahren (Angiographie, Planimetrie, Histologie) konnte die Unabhängigkeit der ermittelten Ergebnisse von der Position des Knorpels in situ nachgewiesen werden.

Ein signifikanter Unterschied in der quantitativen angiographischen Auswertung ergab sich im Gruppenvergleich zwischen Kontrollgruppe und der Gruppe mit den großen Stanzungen (GL).

Durchschnittlich wurden in der Gruppe GL angiographisch signifikant mehr Gefäßschnittpunkte ermittelt, als in der Kontrollgruppe. Zwischen den übrigen Gruppenvergleichen bestanden keine signifikanten Unterschiede.

Die qualitative Auswertung erbrachte ebenfalls einen Unterschied zwischen der Gruppe GL und der Kontrollgruppe bei der arteriellen Auswertung im Gefäßkaliber C. Es konnten keine relevanten Unterschiede zwischen GL und KL, sowie KL und KO in der arterielle Auswertung im Gefäßkaliber C festgestellt werden.

In der venösen Auswertung zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen allen Gruppen GL, KL und KO untereinander im Gefäßkaliber C.

Zusammenfassend wurde in dem Parameter Gefäßkaliber C der quantitativ größte Zuwachs an Gefäßen sowohl venös als auch arteriell nachgewiesen. Die Kapillarausprossung ist nach 8 Wochen angiographisch nachweisbar gewesen mit einer signifikanten Zunahme in der Gruppe GL verglichen mit der Kontrollgruppe.

Im planimetrischen Untersuchungsverfahren wurde ein statistisch signifikanter Unterschied der Hautfläche nach 4 wöchiger Einheilungsphase zwischen GL und der Kontrollgruppe ermittelt. Dabei wies die Gruppe GL im Durchschnitt bei Explantation die größte vitale Hautfläche auf.

Zwischen den anderen Gruppenvergleichen bestand kein relevanter Unterschied.

Die statistische Untersuchung der histologischen Ergebnisse ergab in der Kategorie Knorpelzustand eine signifikant höhere Knorpelvitalität in der Gruppe GL im Vergleich zur Kontrollgruppe, in der Kategorie Subkutis eine signifikant besser erhaltene Schichtung in der Gruppe GL im Vergleich zur Gruppe KL und im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der Kategorie dermale Gefäße zeigten sich signifikant mehr vorhandene dermale Gefäße in der Gruppe GL im Vergleich zur Kontrollgruppe. In den übrigen untersuchten Kategorien zeigten sich keine relevanten Unterschiede in den Gruppenvergleichen.

Als histologischer Überblick über die Knorpelvitalität wurden die knorpelrelevanten, histologischen Parameter zu dem Wert Knorpel allgemein zusammengefasst. Dieser Wert bildet die Knorpelvitalität in ihrer Gesamtheit je Knorpelvariante und Kontrollgruppe ab. Damit konnte eine signifikant höhere Knorpelvitalität in der Knorpelvariante GL im Vergleich zur Kontrollknorpelgruppe gezeigt werden.

Ebenso wurde der Wert Haut allgemein, der die Gesamtheit der hautspezifischen histologischen Parameter in sich vereint, die über die Hautvitalität Auskunft geben, definiert. Für diesen Wert wurde eine signifikant höhere Hautvitalität in der Knorpelvariante GL im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt. Ebenso ergab sich eine signifikant höhere Hautvitalität in der Knorpelvariante KL im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Das Schlüsselkriterium bei diesem Versuchskonzept des Vorhandenseins von Gefäßen im Stanzbereich wurde im Gruppenvergleich GL und KL dargestellt. Dabei ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen zugunsten der Knorpelvariante GL.

Bei der statistischen Auswertung der histologischen Ergebnisse lässt sich insgesamt ebenfalls eine verbesserte Haut- und Knorpelvitalität für die Knorpelvariante GL gegenüber der Kontrollgruppe nachweisen. Es konnten keine relevanten Unterschiede zwischen KL und GL, sowie KL und Kontrollgruppe festgestellt werden.

Im deskriptiven, immunhistochemischen Verfahren zum Endothelnachweis zeichnet sich ein Überwiegen der Gefäßdarstellung im Stanzungsbereich in der Knorpelvariante GL im Unterschied zu KL ab.

### 6.1 Qualität des Knorpels

Um die Qualität des Knorpels darzustellen werden die drei Gruppen GL, KL und die Kontrollgruppe nach dem histologischen und quantitativ angiographischen Analyseverfahren verglichen und die Korrelationskoeffizienten angegeben. Es erfolgen jeweils Paarvergleiche:

	KL mit GL	KL mit KO	GL mit KO
Angiographie	$p > 0,05$	$p > 0,05$	Signifikanz, $p < 0,05$
Histologie	$p > 0,05$	$p > 0,05$	Signifikanz, $p < 0,05$

Tabelle 45: Vitalität Knorpel

### 6.2 Qualität der Haut

Um die Qualität der Haut darzustellen werden die drei Gruppen GL, KL und die Kontrollgruppe nach dem histologischen, quantitativ angiographischen und planimetrischen Analyseverfahren analog dem Kapitel 6.1 verglichen. Es erfolgen jeweils Paarvergleiche:

	KL mit GL	KL mit KO	GL mit KO
Angiographie	p>0,05	p>0,05	Signifikanz, p<0,05
Histologie	p>0,05	p>0,05	Signifikanz, p<0,05
Planimetrie	p>0,05	p>0,05	Signifikanz, p<0,05

Tabelle 46: Vitalität Haut

Aufgrund der richtungsweisenden Tendenzen in den Untersuchungsmodi Angiographie und Histologie ist die Ursache der zahlenmäßig geringen statistischen Signifikanz möglicherweise in dem knappen Beobachtungszeitraum von 8 Wochen ab Knorpelimplantation und der begrenzten Anzahl von 10 operierten Tieren zu vermuten.

Insgesamt konnte nur eine gering ausgeprägte statistisch nicht signifikante Neoangiogenese nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu wurden in den internationalen Studien, wie sie in Kapitel 1.3 beschrieben wurden, teilweise unterschiedliche Knorpelarten verwendet und zum Teil auch andere Nachweismethoden der Gefäßneubildung durchgeführt.

Beispielsweise wurde in einer Studie von Haisch et al. im Jahre 2000 wurde die Protektion autologer Knorpelgrafts vor Resorption in einem neuen Ansatz durch Einkapselung des Grafts mit einem semipermeablen Polyelektrolytkomplex am Mausmodell erfolgreich durchgeführt. Nach einem Beobachtungszeitraum von 4 Monaten nach Implantation zeigte die abgekapselte, humane Septumknorpelgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Anzeichen von gesteigerter Resorptionsaktivität. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Gewebsumhüllung mit einem Polyelektrolytkomplex einen ausreichenden Schutz vor resorptiven Einflüssen bieten kann [50].

In der vorliegenden Studie konnte ein Beitrag zur Förderung der Angiogenese durch unterschiedliche operative Techniken geleistet, sowie die angewandten Untersuchungsverfahren als relevante und zuverlässige Methoden für das Monitoring der Vitalität der Knorpel- und Hautgrafts definiert werden.

Durch diese Studie konnte man Daten über die Neovaskularisation im transplantierten Knorpel ermitteln, die tendenziell in perforiertem Knorpel günstiger sind. In einer Studie von Gubisch et al. (1995) konnte ebenso mikroangiographisch demonstriert werden, dass die Reintegrationsrate von autologen Knorpelgrafts zunimmt, je geringer die Distanz zwischen Chondrozyt und Kapillargefäß ist [48].

Eine Gefäßeinsprossung erfolgte im eigenen Beobachtungszeitraum über kurze Distanzen. Bei intaktem Knorpel wurde diese nur von der Außenseite und den Rändern des Grafts, bei perforiertem Knorpel an allen Perforationen gleichzeitig beurteilt.

Die gewonnenen Daten von chondrokutanen Lappen sind vielversprechend und verstehen sich als Beitrag im Rahmen der wachsenden Knorpelgraft- und tissue-engineering- Forschung.

Die geplante Studie sollte hierüber Auskunft geben, indem

1. der Knorpel vor Transplantation derart bearbeitet wurde, dass eine größtmögliche Bindegewebs- und Kapillareinsprossung induziert wurde. Die Qualität der Neoangiogenese durch angiographischen und histologischen Nachweis dokumentiert wurde.
2. die Transplantate genügend groß gewählt wurden.
3. in einem sekundären Eingriff Vollhaut auf die Knorpelschicht appliziert wurde und das Verhalten des Composite- grafts untersucht wurde.

Die vorliegende Studie diene der genauen Bestimmung der Neoangiogenese in Knorpel-Vollhaut-Transplantaten im Hinblick auf die Verwendung in präfabrizierten Lappen, wie sie im Versuch von Ocampo et al. zur Anwendung kamen [98].

Die Erforschung des Verhaltens von Knorpel in Hautgeweben, sein Einfluß auf die darüberliegende Haut und die Gefäßeinsprossung in dieses System in Abhängigkeit von der Perforation des Knorpels, sowie die Erforschung der spezifischen Vor- und Nachteile waren das Ziel dieser experimentellen Studie.

Vollständigkeitshalber sollen hier einige Teilaspekte aufgezählt werden, die im Rahmen dieser Studie nicht untersucht wurden.

Es wurde nicht auf spezielle Färbemethoden bzw. Darstellungsmöglichkeiten der Kollagenfasern und der elastischen Fasern eingegangen.

Ebenso wurden am Knorpel nach Explantation keine klinischen Funktionstests durchgeführt.

Es wurden keine laborchemischen Untersuchungen am Serum oder am Knorpelmaterial selbst zur Erhebung immunologischer Abläufe unternommen.

## 7 Zusammenfassung

### Einleitung

Seit Einführung der Verwendung von autologen Knorpeltransplantaten in der plastisch - rekonstruktiven Chirurgie Mitte der 70er Jahre werden operative Verfahren zur Optimierung der Vitalität der Knorpelgrafts entwickelt.

Ziel der vorliegenden Studie ist es, die Neovaskularisation im prälaminierten, chondrokutanen Lappen unter dem Einfluss zweier unterschiedlicher operativer Präparationstechniken des Knorpels in einer tierexperimentellen Studie zu untersuchen.

### Material und Methodik

An 12 Chinchilla Bastard Kaninchen wurde eine vergleichende Studie an einem prälaminierten, chondrokutanen Lappen im Bereich der A. epigastrica superficialis durchgeführt.

Nach einseitiger Explantation von elastischem Ohrknorpel wurde dieser jeweils einer Kontrollgruppe und den beiden zu untersuchenden Stanzgruppen zugeordnet. Die beiden Gruppen unterscheiden sich jeweils durch die Anzahl und die Größe der Stanzzyylinder und damit in der Gesamtknorpelfläche. Die Untersuchungsgruppen und die Kontrollgruppe wurden jeweils in jedem Tier als prälaminiertes Lappen der linken A. epigastrica superficialis implantiert.

Nach einer vierwöchigen Einheilungsphase wurde Vollhaut der kontralateralen thorakoabdominalen Seite auf die freigelegten Knorpelareale transplantiert.

Nach einem weiteren Intervall von vier Wochen wurde nach einer Kontrastmittelperfusion mit Bariumsulfat eine Angiographie des chondrokutanen Lappens sowie eines vergleichbar großen, kontralateralen Hautareals zur Darstellung der Vaskularisation durchgeführt.

Es wurde eine planimetrische Untersuchung der transplantierten Vollhaut nach vierwöchiger Einheilungsphase zur Bestimmung der vitalen Hautfläche durchgeführt.

Die lichtmikroskopische histologische Untersuchung des kombinierten Lappens hinsichtlich Morphologie des Knorpels und der Haut sowie Darstellung von Neovaskularisation im Bereich der Knorpelstanzareale erfolgte an mittels H.E. und van Gieson gefärbten Schnitten.



An 10 Tieren erfolgte die angiographische, planimetrische und histologische Auswertung.

An zwei Tieren wurden die Präparatschnitte durch immunhistochemische Untersuchung (Endothelantikörper EC1) auf das Vorhandensein von Endothelzellen im Stanzbereich untersucht.

### **Ergebnisse**

Die Reihenfolge der Knorpelimplantation von kaudal nach kranial hatte keinen Einfluß auf die angiographischen Ergebnisse.

In der quantitativen angiographischen Auswertung war der Gefäßnachweis in der Gruppe GL mit 4mm messender Stanzung signifikant höher als in der Kontrollgruppe KO ( $p < 0,05$ ).

Die qualitative Auswertung erbrachte ebenfalls einen häufigeren Gefäßnachweis in der Gruppe GL im Vergleich zur Kontrollgruppe in der arteriellen Auswertung im Gefäßkaliber C. In der venösen Auswertung zeigten sich im Gefäßkaliber C deutliche Unterschiede zwischen allen Gruppen GL, KL und KO untereinander. In der Gruppe GL ließ sich im Vergleich zu Gruppe KL und zur Kontrollgruppe im Kapillaräquivalent C häufiger venöse Gefäße nachweisen. Ebenso konnten in der Gruppe KL im Vergleich zur Kontrollgruppe häufiger venöse Gefäße mit einem Gefäßkaliber C nachgewiesen werden.

Planimetrisch zeigte sich in der Gruppe GL eine signifikant größere Hautfläche nach 4 wöchiger Einheilungsphase im Verhältnis zum Zeitpunkt der Implantation als in der Kontrollgruppe KO. Zwischen den anderen Paarvergleichen bestand kein signifikanter Unterschied.

Histologisch konnten signifikant mehr Gefäßanschnitte im Stanzbereich der Gruppe GL mit 4mm verglichen mit der Gruppe KL mit 1,0mm Stanzung nachgewiesen werden.

Die knorpelrelevanten, histologischen Parameter zur Darstellung der Knorpelvitalität zusammengefasst. Damit konnte ein signifikant günstigerer histologischer Score für die Gruppe GL mit 4mm Stanzung im Vergleich zur Kontrollgruppe KO erreicht werden.

Ebenso wurde der Wert Haut allgemein, der die Gesamtheit der hautspezifischen histologischen Parameter in sich vereint, die über die Hautvitalität Auskunft geben, bestimmt. Dabei wurde für die Gruppe GL mit 4mm Stanzung eine signifikant bessere Hautvitalität erzielt als in der Kontrollknorpelgruppe. Es zeigte sich ebenso eine signifikante Verbesserung der Hautvitalität in der Gruppe KL mit 1,0mm Stanzung verglichen mit der Kontrollgruppe.

Im deskriptiven, immunhistochemischen Verfahren zeichnete sich ein Überwiegen der Gefäßdarstellung im Stanzungsbereich der Gruppe GL mit 4mm Stanzung im Unterschied zur Gruppe KL mit 1,0mm Stanzung ab.

### **Diskussion**

Insgesamt lag der größte Zuwachs an Gefäßen sowohl arteriell als auch venös bei Gefäßkaliber C, d.h. eine zunehmende Kapillarausprossung ist nach 4 Wochen angiographisch nachweisbar, mit einer signifikant stärkeren Ausprägung in der Gruppe mit 4mm Stanzung.

Bei der statistischen Auswertung der histologischen Ergebnisse lässt sich insgesamt ebenfalls eine signifikant verbesserte Haut- und Knorpelvitalität in der Gruppe mit 4mm Perforation nachweisen.

Zusammenfassend lässt sich über die Evaluation direkter Gefäßparameter (Angiographie, Histologie des Knorpels) und indirekter Gefäßparameter (Planimetrie, Histologie der Haut) eine Verbesserung der Neoangiogenese mit begünstigter Haut- und Knorpelvitalität bei gestanztem Knorpel nachweisen. Innerhalb der gestanzten Knorpelvarianten überwogen diese Vorteile in der Gruppe mit 4mm Stanzung.

In der vorliegenden Studie konnte man einen Beitrag zur Evaluation der Angiogenese durch unterschiedliche operative Techniken leisten, sowie die angewandten Untersuchungsverfahren als relevante und zuverlässige Methoden für das Monitoring der Knorpelgrafts definieren.

Die Gefäßeinsprossung erfolgte in unserem Beobachtungszeitraum über kurze Distanzen. Bei intaktem Knorpel erfolgte die Neovaskularisation nur entlang des Perichondriums, in perforiertem Knorpel jedoch auch transcartilaginär an allen Perforationsstellen und in deutlich höherem Maße in der Gruppe mit den ausgedehnteren Perforationsvolumina.

## 8 Verzeichnisse

### 8.1 Literaturverzeichnis

- 1 Adlington P, Anscombe AJ, Phillips JJ: Influence of the mode of preparation on the long term efficacy of homologous costal cartilage implants.  
J Laryngol Otol 1992; 106: 511-517
- 2 Ancelin M, Buteau-Lozano H, Meduri G, Osborne-Pellegrin M, Sordello S, Plouet J, Perrot-Applanat M: A dynamic shift of VEGF isoforms with a transient and selective progesterone induced expression of VEGF 189 regulates angiogenesis and vascular permeability in human uterus.  
Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 6023-6028
- 3 Arden RL, Smith DM, Salley SO, Dakr WA: Survival of composite chondrocutaneous grafts by vessel implantation. A study in the rabbit ear model.  
Laryngoscope 1995; 105: 1326-1333
- 4 Augustin HG, Breier G: Angiogenesis: molecular mechanisms and functional interactions.  
Thromb Haemost 2003; 89: 190-197
- 5 Beekhuis G: Augmentation mentoplasty with polyamide mesh: update.  
Arch Otolaryngol 1984; 110: 364-367
- 6 Bert MP: Sur la greffe animal.  
Compt Rend Acad Sci 1865; 61: 587-589
- 7 Billingham RE, Medawar PB: The freezing, drying and storage of mammalian skin.  
J Exp Biol 1952; 29: 454-457
- 8 Breadon GE, Kern EB, Neel HB: Autografts of uncrushed and crushed bone

- and cartilage. Experimental observations and clinical implications.  
Arch Otolaryngol 1979; 105: 75-80
- 9 Brent B: Auricular repair with autogenous rib cartilage grafts: two decades of experience with 600 cases.  
Plast Reconstr Surg 1992; 90: 355-374
- 10 Britt JC, Park SS: Autogenous tissue - engineered cartilage: evaluation as an implant material.  
Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1998; 124: 671-677
- 11 Bujia J: Determination of the viability of crushed cartilage grafts: clinical implications for wound healing in nasal surgery.  
Ann Plast Surg 1994; 32: 261-265
- 12 Bujia J, Osete JM, Sprekelsen C, Wilmes E: Vital preservation of cartilage transplants with tissue culture methods.  
Laryngorhinootologie 1994; 73:249-252
- 13 Bujia J, Kremer D, Sudhoff H, Viviente E, Sprekelsen C, Wilmes E: Determination of viability of cryopreserved cartilage grafts.  
Eur Arch Otorhinolaryngol 1995; 252: 30-34
- 14 Bujia J, Osete JM, Sprekelsen C, Wilmes E, Hammer C: Laryngeal reconstruction using allogenic cartilages.  
Laryngoscope 1995; 105: 644-648
- 15 Bujia J: Culturing autologous cartilage tissue for reconstructive surgery: possibilities and limits.  
Laryngorhinootologie 1995; 74: 205-210
- 16 Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, Upton J, Vacanti CA: Transplantation of chondrocytes utilizing polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear.  
Plast Reconstr Surg 1997; 100: 297-302

- 17 Cardenas-Camarena L, Guerrero MT: Use of cartilaginous autografts in nasal surgery: eight years of experience.  
Plast Reconstr Surg 1999; 103:1003-1014
- 18 Carlevaro MF, Albini A, Ribatti D, Gentili C, Benelli R, Cermelli S, Cancedda R, Cancedda FD: Transferrin promotes endothelial cell migration and invasion: implication in cartilage neovascularisation.  
J Cell Biol 1997; 136: 1375-1384
- 19 Clevens RA, Esclamado R, Naficy S: Vascularized auricular perichondrium in airway reconstruction: the effects of stenting with and without a mucosal graft.  
Laryngoscope 1995; 105: 1043-1048
- 20 Collawn SS, Fix RJ, Moore JR, Vasconez LO: Nasal cartilage grafts: more than a decade of experience.  
Plast Reconstr Surg 1997; 100: 1547-1552
- 21 Collier DH, Kerwar SS, Garovoy MR, Fye KH, Stobo JD: Anticollagen antibodies and immune response gene products in rheumatoid arthritis.  
Arthritis Rheum 1984; 27: 1201-1209
- 22 Converse JM, Uhlschmid GK, Ballantyne DL: "Plasmatic circulation" in skin grafts. The phase of serum imbibition.  
Plast Reconstr Surg 1969; 43: 495-499
- 23 Converse J, Wood-Smith D: Carcinoma of the nose.  
Plast Reconstr Surg 1964; 51: 783-825
- 24 Converse JM: Reconstruction of the nasolabial area by composite graft from the conchas.  
Plast Reconstr Surg 1950; 5: 247-251

- 25 Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KA, Stein H, Mason DY. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes).  
J Histochem Cytochem. 1984; 32: 219-229
- 26 Cottle MH: Nasal surgery in children.  
Ear Nose Throat J 1951; 30: 32-38
- 27 David A: The growth of cartilage transplants in baby rabbits.  
Plast Reconstr Surg 1970; 45: 356-363
- 28 Davis WB, Gibson T: Absorption of autogenous cartilage grafts in man.  
Br J Plast Surg 1956; 9: 177-185
- 29 Debbage PL, Griebel J, Ried M, Gneiting T, DeVries A, Hutzler P: Lectin intravital perfusion studies in tumor bearing mice: micrometer resolution, wide area mapping of microvascular labeling, distinguishing efficiently and inefficiently perfused microregions in the tumor.  
J Histochem Cytochem 1998; 46: 627-639
- 30 Diaz-Flores L, Rodriguez E, Gayoso MJ, Gutierrez R: Growth of two types of cartilage after implantation of free autogeneic perichondrial grafts.  
Clin Orthop 1988; 234:267-279
- 31 Donald PJ: Cartilage grafting in facial reconstruction with special consideration of irradiated grafts.  
Laryngoscope 1986; 96: 786-807
- 32 Donald PJ, Col A: Cartilage implantation in head and neck surgery: report of a national survey.  
Otolaryngol Head Neck Surg 1982; 90: 85-89
- 33 Elahi MM, Jackson IT, Moreira Gonzalez A, Yamini D: Nasal augmentation with surgicel wrapped diced cartilage: a review of 67 consecutive cases.

- Plast Reconstr Surg 2003; 111: 1309-1318
- 34 Erol O, The turkish delight: a pliable graft for rhinoplasty.  
Plast Reconstr Surg 2000; 105: 2229-2241
- 35 Erol O, Spira M: Development and utilization of a composite island flap employing omentum: experimental investigation.  
Plast Reconstr Surg 1980; 65: 405-418
- 36 Folkman J: Angiogenesis: initiation and control.  
Ann NY Acad Sci 1982; 401: 212-227
- 37 Folkman J: Tumor angiogenesis.  
Adv Cancer Res 1985; 43: 175-203
- 38 Fujino T, Harashina T, Nakajima T: Free skin flap from the retroauricular region to the nose.  
Plast Reconstr Surg 1976; 57: 338-341
- 39 Gibson T, Davis WB: Some further observations on the use of preserved animal cartilage.  
Br J Plast Surg 1955; 8: 85-92
- 40 Gibson T, Davis B, The distorsion of autogenous cartilage grafts, its cause and prevention.  
Br J Plast Surg 1958; 10: 257-274
- 41 Gibson T: Cartilage and bone transplantation.  
Transplant Proc 1969; 1: 246-250
- 42 Gibson T: Viability of cartilage after freezing.  
Proc R Soc Lond B Biol Sci 1957; 147: 528- 529
- 43 Gillies HO: Plastic surgery of the face.

- London: Oxford University Press 1920: 13-14
- 44 Gillies HO, Kristensen H: Preserved heterogenous cartilage.  
Br J Plast Surg 1951; 4: 73-77
- 45 Glatz F, Neumeister M, Suchy H, Lyons S, Damikas D, Mowlavi A: A tissue-engineering technique for vascularized larynotracheal reconstruction.  
Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2003; 129: 201-206
- 46 Glenn R: Growth of homotransplanted ear cartilage in baby rabbits.  
Plast Reconstr Surg 1975; 55: 479-484
- 47 Grgic I, Eichler I, Heinau P, Si H, Brakemeier S, Hoyer J, Kohler R: Selective Blockade of the Intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup>channel suppresses proliferation of microvascular and macrovascular endothelial cells and angiogenesis in vivo.  
Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005; 3: 64-75
- 48 Gubisch W, Greulich M, Donath K: Experimental and clinical study on the vitality of orthotopic cartilage transplants.  
Plast Reconstr Surg 1995; 95: 663-671
- 49 Guyuron B, Friedman A: The role of preserved autogenous cartilage graft in septorhinoplasty.  
Ann Plast Surg 1994; 32: 255-260
- 50 Haisch A, Groger A, Radke C, Ebmeyer J, Sudhoff H, Grasnick G, Jahnke V, Burmester GR, Sittinger M: Protection of autogenous cartilage transplants from resorption using membrane encapsulation.  
HNO 2000; 48: 119-124
- 51 Hammer C, Bujja J: Immunology of vital and preserved transplants.  
Eur Arch Otorhinolaryngol 1992; 1: 3-26



- 52 Harada K, Torikai K, Funaki J: Augmentation genioplasty with hydroxyapatite blocks: a case report.  
Int J Oral Maxillofac Surg 1993; 22: 265-266
- 53 Hartig GK, Esclamado RM, Telian SA: Comparison of the chondrogenic potential of free and vascularized perichondrium in the airway.  
Ann Otol Rhinol Laryngol 1994; 103: 9-15
- 54 Hellmich S: Fehler und Gefahren bei der freien Knorpeltransplantation im Gesichtsbereich.  
HNO 1982; 30: 140-144
- 55 Heyner S: The significance of the intercellular matrix in the survival of cartilage allografts.  
Transplantation 1969; 8: 666-677
- 56 Hodin E, Martinot V, Patenotre P, Mortier P: Reconstruction of loss of substance on the nose by composite auricular grafts.  
Ann Chir Plast Esthet 1996; 41: 284-294
- 57 Holle J, Plastische Chirurgie.  
Hippokrates Verlag, Stuttgart 1994; 34-56
- 58 Jasin HE: Autoantibody specificities of immune complexes sequestered in articular cartilage of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis.  
Arthritis Rheum 1985; 28: 241-248
- 59 Kastenbauer E: Konservierung und Anwendungsmöglichkeiten allogener Transplantate im Hals-Nasen-Ohrenbereich.  
HNO 1983; 31: 371-380
- 60 Kawabe N, Yoshinao M: Cryopreservation of cartilage.  
Int Orthop 1990; 14: 231- 235

- 61 Keck T, Lindemann J, Kuhnemann S, Sigg O: Healing of composite chondrocutaneous auricular grafts covered by skin flaps in nasal reconstructive surgery.  
Laryngoscope 2003; 113: 248-253
- 62 Kenedi RM, Gibson T, Daly CH, Abrahams M: Biomechanical characteristics of human skin and costal cartilage.  
Fed Proc 1966; 25: 1084-1087
- 63 Keskin IG, Oz F, Oz B, Oktem F, Gustafson M: Tracheal reconstruction using alcohol-stored homologous cartilage and autologous cartilage in the rabbit model.  
Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2000; 56: 161-167
- 64 Khouri RK, Brown DM, Leal-Khouri SM, Tark KC, Shaw WW: The effect of fibroblast growth factor on the neovascularisation process: skin flap survival and staged flap transfer.  
Br J Plast Surg 1991; 44: 585-588
- 65 Kiyoshi M, Takeshi H, Nobuyuki T, Motonao I, Reiko S: Lower eyelid reconstruction with a conchal cartilage graft.  
Plast Reconstr Surg 1986; 80: 547-551
- 66 Kiyoshi M, Takeshi H, Nobuyuki T, Motonao I, Reiko S: Lid margin reconstruction with an orbicularis oculi musculocutaneous advancement flap and a conchal cartilage graft.  
Plastic Reconstr Surg 1991; 87: 142-149
- 67 Klooster AR, Bernier SM: Tumor necrosis factor alpha and epidermal growth factor act additively to inhibit matrix gene expression by chondrocyte.  
Arthritis Res Ther 2005; 7: 127-138
- 68 Koch RJ, Gorti GK: Tissue engineering with chondrocytes.  
Facial Plast Surg 2002; 18: 59-68

- 69 Kolhe PS, Leonard AG: The posterior auricular flap: anatomical studies.  
Br J Plast Surg 1987; 40: 562-569
- 70 Konig F: Zur Deckung von Defekten in der vorderen Trachealwand.  
Berl Klin Wochenschr 1896; 51: 1129-1131
- 71 Koshima I, Umeda N, Moriguchi T, Handa T, Akisada K, Orita Y: A full thickness chondrocutaneous flap from the auricular concha for repair of tracheal defects.  
Plast Reconstr Surg 1997; 99: 1887-1893
- 72 Kremer D, Bujia J: Enzyme digestion of autologous cartilage transplants. New possibilities for vital cryopreservation.  
Laryngorhinootologie 1995; 74: 76-80
- 73 Lavezzi A, Mantovani M, Della Berta LG, Maturri L: Cell kinetics of human nasal septal chondrocytes in vitro: importance for cartilage grafting in otolaryngology.  
J Otolaryngol 2002; 31: 366-370
- 74 Leonard AG, Kolhe PS: The posterior auricular flap: intra-oral reconstruction.  
Br J Plast Surg 1987; 40: 570-581
- 75 Lewin ML: Formation of the helix with a postauricular flap.  
Plast Reconst Surg 1950; 5: 432-440
- 76 Li WJ, Tuli R, Okafor C, Derfoul A, Danielson KG, Hall DJ, Tuan RS: A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells.  
Biomaterials 2005; 26: 599-609
- 77 Li TF, O'Keefe RJ, Chen D: TGF-beta signaling in chondrocytes.  
Front Biosci 2005; 10: 681-688

- 78 Maciag T: Angiogenesis.  
Prog Hemost Thromb 1984; 7: 167-182
- 79 Maillard GF, Montandon D: The Washio temporo-retroauricular flap: its use in 20 patients.  
Plast Reconstr Surg 1982; 70: 550-560
- 80 Mannheim A, Zypkin B: Free autoplasmic cartilage transplantation.  
JAMA 1926; 87: 2132-2137
- 81 Marcus R: On closed testing procedures with special reference to ordered analysis of variance.  
Biometrika 1976; 63: 655-660.
- 82 Marijnissen WJ, van Osch GJ, Aigner J, van der Veen SW, Hollander AP, Verwoerd-Verhoef HL, Verhaar JA: Alginate as a chondrocyte delivery substance in combination with a non woven scaffold for cartilage tissue engineering. Biomaterials 2002; 23: 1511-1517
- 83 Matsuo K, Sakaguchi Y, Kiyono M, Hataya Y, Hirose T: Lid margin reconstruction with an orbicularis oculi musculocutaneous advancement flap and a conchal cartilage graft.  
Plast Reconstr Surg 1991; 87: 142-145
- 84 McCarthy C: Plastic surgery general principles.  
W.B. Saunders Company 1990; 1: 275-313, 475-482
- 85 McCollough EG, Hom DB, Weigel MT, Anderson JR: Augmentation mentoplasty using Mersilene mesh.  
Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1990; 116: 1154-1158
- 86 McLaughlin CR: Composite ear grafts and their blood supply.  
Br J Plast Surg 1955; 7: 274-281

- 87 Moenning JE, Wolford LM: Chin augmentation with various alloplastic materials: a comparative study.  
Int J Adult Orthodon Orthognath Surg 1989; 4: 175-187
- 88 Morrison WA, Dvir E, Doi K, Hurley JV, Hickey MJ, O'Brien BM:  
Prefabrication of thin transferable axial-pattern skin flaps: an experimental study in rabbits.  
Br J Plast Surg 1990; 43: 645-654
- 89 Mowlem R: Bone and cartilage transplants. Their use and behaviour.  
Br J Surg 1941; 29: 182-193
- 90 Mutaf M, Celebioglu S, Sensoz O : Growth potential of autogenous cartilage grafts in expanded skin, experimental study in rabbits.  
Ann Plast Surg 1994; 32: 126-131
- 91 Nagata S: Total auricular reconstruction with a three-dimensional costal cartilage framework.  
Ann Chir Plast Esthet 1995; 40: 371-399
- 92 Naumann A, Bujia J: More precise characterization of humoral immune reactivity to cartilage tissue in patients with resorption of cartilage transplants in the area of the head and neck.  
Laryngorhinootologie 1995; 74: 69-75
- 93 Neu BR: Combined conchal cartilage ethmoid bone grafts in nasal surgery.  
Plast Reconstr Surg 2000; 106: 171-175
- 94 New GB, Erich JB: A method to prevent fresh costal cartilage grafts from warping.  
Am J Surg 1941; 54: 435-438
- 95 Newman J, Dolsky RL, Mai ST: Submental liposuction extraction with hard chin augmentation.

- Arch Otolaryngol 1984; 110: 454-457
- 96 Nguyen TH, Klöppel M, Staudenmaier R, Biemer E: Experimental investigation of neovascularisation in large prefabricated flaps after arteriovenous pedicle implantation.  
Handchir Mikrochir Plast Chir 2004; 36: 212-217
- 97 North JF: The use of preserved bovine cartilage in plastic surgery.  
Plast Reconstr Surg 1953; 11: 261-274
- 98 Ocampo C et al.: Heterotope Augenhöhlen- und Augenlidrekonstruktion.  
Med. Diss. TU München 2005
- 99 O'Connor G, Pierce G: Outcome of preserved cartilage isografts in 375 cases.  
Surg Gyn Obst 1938; 67: 796-798
- 100 Ogi N, Kurita K, Handa Y, Goss AN: The short-term effect of autogenous auricular cartilage graft following discectomy on the osteoarthrotic temporomandibular joint in sheep.  
Int J Oral Maxillofac Surg 1997; 26: 217-222
- 101 Orticochea M: Refined technique for reconstructing the whole nose with the conchas of the ears.  
Br J Plast Surg 1980; 33: 68-73
- 102 Padgett E, Stephenson K: Evaluation of preserved cartilage transplants.  
Plast Reconstr Surg 1948; 1: 99-105
- 103 Paacock EE, Weeks PM: Some studies on antigenicity of cartilage.  
Ann NY Acad Sci 1960; 87: 175-184

- 104 Panossian A, Ashiku S, Kirchoff CH, Randolph MA, Yaremchuk MJ: Effects of cell concentration and growth period on articular and ear chondrocyte transplants for tissue engineering.  
Plast Reconstr Surg 2001; 108: 392-402
- 105 Park SS, Rodeheaver GT, Levine PA: Role of ischemic gradient in neovascularisation of interpolated skin flaps.  
Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1996; 122: 886-889
- 106 Parkhouse N, Evans D: Reconstruction of the ala of the nose using a composite free flap from the pinna.  
Br J Plast Surg 1985; 38: 306-313
- 107 Polido WD, Bell WH: Long term osseous and soft tissue changes after large chin advancements.  
J Craniomaxillofac Surg 1993; 21: 54-59
- 108 Pribaz JJ, Weiss DD, Mulliken JB, Eriksson E: Prelaminated free flap reconstruction of complex central facial defects.  
Plast Reconstr Surg 1999; 104: 357-365
- 109 Princ G, Slama M, Zerbib R, Vaillant JM : The value of projection genioplasty using silicone endoprotheses.  
Rev Stomatol Chir Maxillofac 1988; 89: 119-121
- 110 Ramon M: Reconstruction of the rabbit trachea with vascularised auricular perichondrium.  
Ann Otol Rhinol Laryngol 1996; 105: 356-360
- 111 Richardson G: Methods of tissue preparation.  
Am J Pathol 1984; 117: 625-636

- 112 Ritsilä VA, Santavirta S, Alhopuro S, Poussa M, Jaroma H, Rubak JM, Eskola A, Hoikka V, Snellman O, Osterman K: Periosteal and perichondral grafting in reconstructive Surgery.  
Clin Orthop 1994; 302: 259-265
- 113 Ritsilä VA, Alhopuro S: Regeneration of articular cartilage defects with free perichondral grafts.  
IRCS Med Sci 1975; 3: 49-55
- 114 Ritsilä VA, Alhopuro S, Gylling U, Rintala A: The use of free periosteum for bone formation in congenital clefts of the maxilla.  
Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg 1972; 6: 57-60
- 115 Ritsilä VA, Alhopuro S, Rintala A: Bone formation with free periosteum. An experimental study.  
Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg 1972; 6: 51-56
- 116 Rodriguez A, Cao YL, Ibarra C, Pap S, Vacanti M, Eavey RD, Vacanti CA: Characteristics of Cartilage engineered from human pediatric auricular cartilage.  
Plast Reconstr Surg 1999; 103: 1111-1119
- 117 Romeis B: Doppelfärbung mit Hämalaun-Eosin.  
In :“ Mikroskopische Technik“ Romeis B ( Hrsg.), 16. Auflage, Oldenburg-Wien 1968; 235-236
- 118 Rubak JM: Osteochondrogenesis of free periosteal grafts in the rabbit iliac crest.  
Acta Orthop Scand 1983; 54: 826-31
- 119 Rudderman RH, Guyuron B, Mendelsohn G: The fate of fresh and preserved, noncrushed and crushed autogenous cartilage in the rabbit model.  
Ann Plast Surg 1994; 32: 250-254



- 120 Schacher NS: Cryopreservation of articular cartilage for transplantation.  
Sapporo Med J 1987; 56: 157-161
- 121 Schiebler T, Schneider F: Knorpel.  
In: „Histologie“ Junqueira L, Carneiro J, Schiebler T, Schneider F (Hrsg.), 3.  
Auflage, Springer - Verlag, Berlin – Heidelberg - New York 1991; 180-189
- 122 Shaber EP: Vertical interpositional augmentation genioplasty with porous  
polyethylene.  
Int J Oral Maxillofac Surg 1987; 16: 678-681
- 123 Sheen JH: The ideal dorsal graft: a continuing question.  
Plast Reconstr Surg 1998; 102: 2490-2493
- 124 Shen T: Experimental study of tissue graft vascularization by means of  
vascular implantation and subcutaneous burying.  
Plast Reconstr Surg 1984; 73: 403-409
- 125 Sidky YA, Auerbach R: Lymphocyte-induced angiogenesis: a quantitative  
and sensitive assay of the grafts-versus-host reaction.  
J Exp Med 1975; 141: 1084-1100
- 126 Siebert CH, Miltner O, Weber M, Sopka S, Koch S, Niedhart C: Healing of  
osteochondral grafts in an ovine model under the influence of bFGF.  
Arthroscopy 2003; 19: 182-187
- 127 Siewert JR: Unfallheilkunde  
In: „Chirurgie“ Siewert JR (Hrsg.),  
Springer–Verlag, Berlin–Heidelberg–New York 1998: 814-817
- 128 Silverman RP, Bonasser L, Passaretti D, Randolph MA, Yaremchuk MJ:  
Adhesion of tissue engineered cartilage to native cartilage.  
Plast Reconstr Surg 2000; 105: 1393-1398

- 129 Smith RO, Dickinson JT, Cipcic JA: Composite grafts in facial reconstructive surgery.  
Arch Otolaryngol 1972; 95: 252-264
- 130 Stepan D, Valka J, Samohyl J, Meyer VE, Smahel J: Prefabrication of a skin axial flap in experiment.  
Acta Chir Plast 1993; 35: 28-35
- 131 Straiht C, Slaughter W: Preserved cartilage isografts.  
JAMA 1941; 116: 2008-2013
- 132 Strauss P, Schreiter K: Preserved human cartilage grafts and autogenous viable transplants for nose and middle ear.  
Laryngol Rhinol Otol 1979; 58: 201-209
- 133 Suzuki Y, Suzuki S, Ishikawa K: Direct monitoring of the microcirculation in experimental venous flaps with afferent arteriovenous fistulas.  
Br J Plast Surg 1994; 47: 554-559
- 134 Tanzer RC: The reconstruction of acquired defects of the ear.  
Plast Reconstr Surg 1965; 35: 355-365
- 135 Tanzer R: Total reconstruction of the auricle. The evaluation of a plan of treatment.  
Plast Reconstr Surg 1971; 47: 523-533
- 136 Tark KC, Tuchler RE, Shaw WW: Flap prefabrication: effectiveness of different vascular carriers.  
Ann Plast Surg 1996; 37: 298-304
- 137 Ten Koppel PG, van Osch GJ, Verwoerd CD, Verwoerd-Verhoef HL: Efficacy of perichondrium and trabecular demineralized bone matrix for generating cartilage.  
Plast Reconstr Surg 1998; 102: 2012-2020

- 138 Thakrai KK, Goodson WH, Hunt TK: Stimulation of wound blood vessel growth by wound macrophages.  
J Surg Res 1979; 26: 430-436
- 139 Tojo T, Niwaya K, Sawabata N, Kushibe K, Nezu K, Taniguchi S, Kitamura S: Tracheal replacement with cryopreserved tracheal allograft: experiment in dogs.  
Ann Thorac Surg 1998; 66: 209-213
- 140 Toranto IR: Mentoplasty: a new approach.  
Plast Reconstr Surg 1982; 69: 875-878
- 141 Uddstromer L, Ritsilä V: Osteogenic capacity of periosteal grafts. A qualitative and quantitative study of membranous and tubular bone periosteum in young rabbits.  
Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg 1978; 12: 207-214
- 142 Uddstromer L, Ritsilä V: Healing of membranous and long bone defects. An experimental study in growing rabbits.  
Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg 1979; 13: 281-287
- 143 Urist MR, McLean FC: Osteogenic potency and new bone formation in transplants to the anterior chamber of the eye.  
J Bone Joint Surg Am 1952; 34: 443-476
- 144 van Osch GJ, van der Veen SW, Verwoerd-Verhoef HL: In vitro redifferentiation of culture expanded rabbit and human auricular chondrocytes for cartilage reconstruction.  
Plast Reconstr Surg 2001; 107: 433-440
- 145 Verwoerd CD, Verwoerd-Verhoef HL, Meeuwis CA, van der Heul RO: Wound healing of autologous implants in the nasal septal cartilage.  
J Otorhinolaryngol Relat Spec 1991; 53: 310-314

- 146 Viterbo F: Chin augmentation with conchal cartilage.  
Plast Reconstr Surg 2003; 111: 899-903
- 147 Voy ED: Vascularization and resorption of different supporting tissues by the greater omentum in the formation of compound microvascular transplants.  
Handchir Mikrochir Plast Chir 1985; 17: 62-65
- 148 Wada M, Fujino T, Harashina T: Anatomic description of the free retroauricular flap.  
J Microsurg 1979; 8: 108-115
- 149 Washio H: Retroauricular-temporal flap.  
Plast Reconstr Surg 1969; 43: 162-166
- 150 Washio H: Further experiences with the retroauricular temporal flap.  
Plast Reconstr Surg 1972; 50: 160-162
- 151 Weinstein RA, Rubinstein AS, Choukus NC: Sequential electron microscopic healing study of grafted palatal mucosa.  
J Dent Res 1976; 55: 16-21
- 152 Westhues M: Antigenic effect of cartilage. Determination of antibodies against isologous cartilage tissue in rats.  
Z Laryngol Rhinol Otol 1971; 50: 57-60
- 153 Westreich R, Kaufman M, Gannon P, Lawson W: Validating the succutaneous model of injectable autologous cartilage using a fibrin glue scaffold.  
Laryngoscope 2004; 114: 2154-2160
- 154 Wiseman JB, Holt GR, Keefe MA, Holck DE, Canaan RL, Clark WD: The fate of fresh, layered, non sutured and sutured, autogenous cartilage in the rabbit model. Arch Facial Plast Surg 2000; 2: 256-259

- 155 Yilmaz S, Ercocen AR, Can Z, Yenidunya S, Edali N, Yormuk E: Viability of diced, crushed cartilage grafts and the effects of surgicel (oxidized regenerated cellulose) on cartilage grafts.  
Plast Reconstr Surg 2001; 108: 1054-1060
- 156 Yotsuyanagi T, Urushidate S, Watanabe M, Sawada Y: Reconstruction of a three dimensional structure using cartilage regenerated from the perichondrium of rabbits.  
Plast Reconstr Surg 1999; 103: 1120-1123
- 157 Yotsuyanagi T, Nihei Y, Sawada Y: Reconstruction of defects involving the upper one third of the auricle.  
Plast Reconstr Surg 1998; 102: 988-992
- 158 Zhou ZY, Nitcher LS, West BR, Navarrette PM: Evaluation of a temporary arteriovenous shunt to establish neovascularization in a musculocutaneous flap. An experimental study.  
Microsurgery 1994; 15: 63-69

**8.2 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Charakteristische Unterschiede zwischen Kollagenfasern und elastischen Fasern, Schiebler et al. [120].....	7
Tabelle 2: Übersicht der drei unterschiedlichen Knorpelarten, Schiebler et al. [120].....	8
Tabelle 3: Gruppeneinteilung.....	36
Tabelle 4: Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs mit Implantation der drei Untersuchungsgruppen (GL,KL und Kontrollgruppe) in jeweils jedes Tier.....	36
Tabelle 5: Position der Knorpelimplantate in situ.....	45
Tabelle 6: Qualitative Auswertung der Angiographie: arterielles Gefäßsystem GL, ngl.....	60
Tabelle 7: Qualitative Auswertung der Angiographie: arterielles Gefäßsystem KL, nkl.....	60
Tabelle 8: Qualitative Auswertung der Angiographie: arterielles Gefäßsystem KO, nko.....	61
Tabelle 9: Darstellung der planimetrischen Ergebnisse bei Implantation und Explantation.....	64
Tabelle 10: Arithmetische Mittelwerte (m) der planimetrischen Messung bei Implantation (1) und bei Explantation(2) der Kontrollgruppe KO, KL und GL.....	64
Tabelle 11: Scoreverfahren und Parameter zur histologischen Auswertung der Knorpelvitalität.....	68
Tabelle 12: Scoreverfahren und Parameter zur histologischen Auswertung der Hautvitalität.....	69
Tabelle 13: Endotheliale Antikörper.....	70
Tabelle 14: Parameter zur Evaluierung der Immunhistologie.....	76
Tabelle 15: Versuchstiere.....	78
Tabelle 16: Klinisch-makroskopische Beurteilung der Wundheilung.....	79
Tabelle 17: Scoretabelle zur klinisch-makroskopischen Beurteilung von Knorpel- und Hauttransplantat.....	80
Tabelle 18: Klinisch-makroskopische Beurteilung der Knorpelvitalität.....	80

Tabelle 19: Klinisch-makroskopische Beurteilung der Hautvitalität.....	80
Tabelle 20: Quantitative Gefäßauszählung am chondrokutanen Lappen.....	82
Tabelle 21: Quantitative Gefäßauszählung am nativen Hautlappen.....	82
Tabelle 22: Darstellung der Differenz von quantitativer Gefäßauszählung am chondrokutanen Lappen und am nativen Hautlappen. ....	83
Tabelle 23: Deskriptive Statistik, DGL_M_SL, DKL_M_SL, DKO_M_SL.....	89
Tabelle 24: Wilcoxon Test.....	89
Tabelle 25: Deskriptive Statistik, DGL_EFF, DKL_EFF.....	91
Tabelle 26: qualitative, kombinierte arterielle und venöse Ergebnisdarstellung von GL.....	92
Tabelle 27: Qualitative, kombinierte arterielle und venöse Ergebnisdarstellung von ngl.....	92
Tabelle 28: Qualitative, kombinierte arterielle und venöse Ergebnisdarstellung von KL.....	93
Tabelle 29: Qualitative, kombinierte arterielle und venöse Ergebnisdarstellung von nkl.....	93
Tabelle 30: Qualitative, kombinierte arterielle und venöse Ergebnisdarstellung von KO.....	93
Tabelle 31: Qualitative, kombinierte arterielle und venöse Ergebnisdarstellung von nko.....	94
Tabelle 32: Qualitativ-angiographische Darstellung DGL, DKL und DKO für die Kategorie Arterie, Gefäßkaliber A,B,C.....	96
Tabelle 33: Statistische Auswertung der qualitativ-angiographischen Ergebnisse DGL, DKL und DKO für die Kategorie Arterie, Gefäßkaliber A,B,C.....	96
Tabelle 34: Qualitativ-angiographische Darstellung DGL, DKL und DKO für die Kategorie Vene, Gefäßkaliber A,B,C.....	98
Tabelle 35: Qualitativ-angiographische Auswertung DGL, DKL und DKO für die Kategorie Vene, Gefäßkaliber A,B,C.....	99
Tabelle 36: Planimetrie KO, Messzeitpunkt 1 und 2 (1., 2.), Position (1, 2, 3), Mittelwert zum Messzeitpunkt 1 und 2 (1m, 2m).....	101
Tabelle 37: Planimetrie KL, Messzeitpunkt 1 und 2 (1., 2.), Position (1, 2, 3), Mittelwert zum Messzeitpunkt 1 und 2 (1m, 2m).....	101

Tabelle 38: Planimetrie GL, Messzeitpunkt 1 und 2 (1., 2.), Position (1, 2, 3), Mittelwert zum Messzeitpunkt 1 und 2 (1m, 2m).....	102
Tabelle 39: Vitale Hautfläche (%) bei Explantation.....	102
Tabelle 40: Planimetrie, deskriptive Statistik.....	104
Tabelle 41: Histologische, semiquantitative Scoreauswertung des chondrocutanen Lappens GL.....	106
Tabelle 42: Histologische, semiquantitative Scoreauswertung des chondrocutanen Lappens KL.....	107
Tabelle 43: Histologische, semiquantitative Scoreauswertung des chondrocutanen Lappens KO.....	107
Tabelle 44: Immunhistochemische Auswertung für GL, KL und KO.....	122
Tabelle 45: Vitalität Knorpel.....	142
Tabelle 46: Vitalität Haut.....	143



### 8.3 **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Elastischer Knorpel (Chondrozyt=CH), elastische Fasern (EF) bilden Fasernetzwerk im Interterritorium, Färbung nach Weigert, Vergrößerung 200fach aus Schiebler T, Schneider F (1991).....	10
Abb. 2: Schematische Darstellung der drei Knorpelgruppen.....	35
Abb. 3: Infiltrationsanästhesie am Ohr.....	37
Abb. 4: Lagerung des Kaninchens nach steriler Abdeckung.....	38
Abb. 5: Metallschablone zur Herstellung der Stanzgröße KL mit einem Durchmesser von 1,5mm.....	39
Abb. 6: Biopsie Punch zur Herstellung der Stanzgröße GL mit einem Durchmesser von 4mm.....	40
Abb. 7: Chirurgisches Instrumenteset.....	40
Abb. 8: Präparation des Ohrknorpels.....	41
Abb. 9: Metallschablone, Straußenkanüle®, Knorpelgruppe KL.....	42
Abb. 10: Knorpelgruppe GL, Biopsie Punch.....	42
Abb. 11: 4mm gestanzter Knorpel links (GL), 1,5mm gestanzter Knorpel in der Mitte (KL) und nativer Knorpel rechts (KO).....	43
Abb. 12: A. und V. epigastrica superficialis sinistra (A / V) .....	43
Abb. 13: Eingriff I nach heterotoper Knorpelimplantation auf die A. und V. epigastrica superficialis.....	44
Abb. 14: Abdominale Vollhautentnahme.....	46
Abb. 15: Eingriff II nach Vollhautimplantation.....	47
Abb. 16: Eingriff II nach Vollhautimplantation mit kontralateraler Hebedefektdeckung (HD).....	47

Abb. 17: Katheterisierung der A. femoralis communis (AF).....	50
Abb. 18: Perfusion mit Ringer Lösung, kontralateral bereits mit Bariumsulfat, schwarze Punkte markieren die Ecken der eingehielten Vollhaut.....	50
Abb. 19: Regelrechte Bariumsulfatperfusion der A. epigastrica superficialis (A).....	51
Abb. 20: Bariumperfusion der A.epigastrica superficialis beidseits.....	51
Abb. 21: Präparation des prälaminierten, chondrokutanen Lappens nach Bariumsulfatperfusion.....	52
Abb. 22: Ausgewählte Angiographien der chondrokutanen Lappen (rosa Rechtecke) zum Zeitpunkt der Schlusspräparation mit Darstellung der A. und V. epigastrica superficialis (roter Pfeil), Klemme nach Biemer (gelber Stern).....	56
Abb. 23: Auswertungsschablone für Angiographie.....	57
Abb. 24: Vollhaut bei Implantation.....	63
Abb. 25: Vollhaut nach 4wöchiger Einheilungsphase (die schwarzen Punkte kennzeichnen die Ecken des eingehielten Vollhautgewebes).....	63
Abb. 26: Schnittebenen der histologischen Präparate.....	65
Abb. 27: Schnittführung im gestanzten Areal.....	65
Abb. 28: Histologie GL, 2,5fache Vergrößerung, Micropaque ® gefüllte Gefäße (MP), in den Perforationsdefekt eingesprosses Bindegewebe (B), Chondrozyten (CH).....	66
Abb. 29: Histologie GL, 5fache Vergrößerung, Mikropaque ® gefüllte Gefäße (MP), in den Perforationsdefekt eingesprosses Bindegewebe (B), Chondrozyten (CH).....	66
Abb. 30: Histologie KL, 10fache Vergrößerung, in den Perforationsdefekt eingesprosses Bindegewebe (B), Chondrozyten (CH).....	67
Abb. 31: Histologie KO, 20fache Vergrößerung, Chondrozyten (CH.).....	67
Abb. 32: Immunhistochemischer Endothelnachweis € in der Gruppe GL, 5fache Vergrößerung, Chondrozyten (CH), in den Perforationsdefekt eingesprosses Bindegewebe (B).....	74
Abb. 33: Immunhistochemischer Endothelnachweis (E) in der Gruppe GL, 40fache Vergrößerung.....	74

Abb. 34: Immunhistochemischer Endothelnachweis (E) in der Gruppe KL, 20fache Vergrößerung, in den Perforationsdefekt eingesprosstes Bindegewebe (B), Chondrozyten (CH).....	75
Abb. 35: Immunhistochemischer Endothelnachweis (E) in der Gruppe KO, 20fache Vergrößerung, Chondrozyten (CH).....	75
Abb. 36: DGL_1_SL bis DGL_4_SL: Quantitativ-angiographische Darstellung der Gefäßschnittpunkte in der Knorpelgruppe GL je Schnittlinie 1-4, abzüglich der jeweiligen Werte an der kontralateralen Seite, n=10....	84
Abb. 37: DKL_1_SL bis DKL_4_SL: Quantitativ-angiographische Darstellung der Gefäßschnittpunkte in der Knorpelgruppe KL je Schnittlinie 1-4, abzüglich der jeweiligen Werte an der kontralateralen Seite, n=10.....	85
Abb. 38: DKO_1_SL bis DKO_4_SL: Quantitativ-angiographische Darstellung der Gefäßschnittpunkte in der Knorpelgruppe KO je Schnittlinie 1-4, abzüglich der jeweiligen Werte an der kontralateralen Seite, n=10.....	86
Abb. 39: Abhängigkeit der Anzahl der Gefäßschnittpunkte von der Position 1/kaudal, 2/mittig, 3/kranial des Knorpelquadrats GL.....	87
Abb. 40: Abhängigkeit der Anzahl der Gefäßschnittpunkte von der Position 1/kaudal, 2/mittig, 3/kranial des Knorpelquadrats KL.....	88
Abb. 41: Abhängigkeit der Anzahl der Gefäßschnittpunkte von der Position 1/kaudal, 2/mittig, 3/kranial der Kontrollgruppe KO.....	88
Abb. 42: Quantitativ-angiographischer Gruppenvergleich.....	90
Abb. 43: Quantitativ-angiographischer Gruppenvergleich, DGL_EFF und DKL_EFF.....	91
Abb. 44: Qualitativ-angiographische Ergebnisdarstellung DGL, DKL und DKO für die Kategorie Arterie, Gefäßkaliber A, n=10.....	94
Abb. 45: Qualitativ-angiographische Ergebnisdarstellung DGL, DKL und DKO für die Kategorie Arterie, Gefäßkaliber B, n=10.....	95
Abb. 46: Qualitativ-angiographische Ergebnisdarstellung DGL, DKL und DKO für die Kategorie Arterie, Gefäßkaliber C, n=10.....	95
Abb. 47: Qualitativ-angiographische Ergebnisdarstellung DGL, DKL und DKO für die Kategorie Vene, Gefäßkaliber A, n=10.....	97

Abb. 48: Qualitativ-angiographische Ergebnisdarstellung DGL, DKL und DKO für die Kategorie Vene, Gefäßkaliber B, n=10.....	97
Abb. 49: Qualitativ-angiographische Ergebnisdarstellung DGL, DKL und DKO für die Kategorie Vene, Gefäßkaliber C, n=10.....	98
Abb. 50: Qualitativ-angiographischer Vergleich arteriell und venös im Gefäßkaliber C innerhalb der Knorpelgruppe GL.....	99
Abb. 51: Qualitativ-angiographischer Vergleich arteriell und venös im Gefäßkaliber C innerhalb der Knorpelgruppe KL.....	100
Abb. 52: Qualitativ-angiographischer Vergleich arteriell und venös im Gefäßkaliber C innerhalb der Knorpelgruppe KO.....	100
Abb. 53: Planimetrie Positionsvergleich, GL.....	103
Abb. 54: Planimetrie Positionsvergleich, KL.....	103
Abb. 55: Planimetrie Positionsvergleich, KO.....	104
Abb. 56: Planimetrie, Gruppenvergleich GL, KL, KO.....	105
Abb. 57: Histologie, Gruppenvergleich Knorpelzustand.....	108
Abb. 58: Histologie, Gruppenvergleich Perichondriumzustand.....	109
Abb. 59: Histologie, Gruppenvergleich Hautoberfläche.....	110
Abb. 60: Histologie, Gruppenvergleich Subcutis.....	111
Abb. 61: Histologie, Gruppenvergleich Haarfollikel.....	112
Abb. 62: Histologie, Gruppenvergleich Drüsen.....	113
Abb. 63: Histologie, Gruppenvergleich dermale Gefäße.....	114
Abb. 64: Histologie, Gruppenvergleich Knorpel allgemein.....	115
Abb. 65: Histologie, Gruppenvergleich Haut allgemein.....	116
Abb. 66: Histologie, Gruppenvergleich Gefäße im Stanzbereich.....	117
Abb. 67: Histologie, Knorpel, Positionsvergleich, GL.....	118
Abb. 68: Histologie, Knorpel, Positionsvergleich, KL.....	119
Abb. 69: Histologie, Knorpel, Positionsvergleich, KO.....	119
Abb. 70: Histologie, Haut, Positionsvergleich, GL.....	120
Abb. 71: Histologie, Haut, Positionsvergleich, KL.....	121
Abb. 72: Histologie, Haut, Positionsvergleich, KO.....	121

## 9 Anhang

### 9.1 Curriculum Vitae

Isabelle, Katrin Himsl,  
geboren am 30.12.1973 in Augsburg

*Adresse*                      Tumblingerstr. 38  
80337 München

#### *Schule*

Sep. 1980 – Jul. 1984    Grundschule, Neuötting  
Sep. 1984 – Jul. 1993    Gymnasium der Englischen Fräulein, Altötting  
Allgemeines Abitur, Note: 1,3

#### *Universität*

Nov. 1993 – Jul. 1994    Biologiestudium an der Universität Regensburg  
Nov. 1994 – Jul. 1996    Humanmedizinstudium, Vorklinik an der Universität  
Regensburg  
Physikum, Note:1,6  
Nov. 1996 – Mai 2001    Humanmedizinstudium, Klinik an der Technischen  
Universität München  
Sep. 1997                    I. Staatsexamen, Note: 2,0  
Mär. 2000                    II. Staatsexamen, Note: 1,3  
Mai 2001                     III. Staatsexamen, Note: 2,0

#### *Promotion*

Jan. 1998 – Mai 2005    Prälamination eines axialen Lappens mit Knorpel- und  
Vollhauttransplantat.  
Eine experimentelle Studie am Kaninchen.  
Abteilung für Plastische und Wiederherstellungschirurgie,

Abteilung für Experimentelle Chirurgie am Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München.

*Praktische Tätigkeiten*

- Sep. 1994 Krankenpflegepraktikum allgemeine Chirurgie am Kreiskrankenhaus Altötting
- Mär. 1995 Krankenpflegepraktikum in der HNO am Kreiskrankenhaus Altötting
- Mär. 1997 Famulatur in der Abteilung für Viszeralchirurgie am Maria – Theresia Krankenhaus in München
- Okt. 1997 Famulatur in der Abteilung für Herz-, Thorax- und Gefässchirurgie am Inselspital in Bern, Schweiz
- Aug. 1998 HNO Famulatur, München
- Sep. 1998 Pädiatrie Famulatur, München
- Mär. 1999 – Apr. 1999 Famulatur in der Abteilung für Plastische und Wiederherstellungschirurgie am Brigham & Women's Hospital, Boston, USA
- Apr. 2000 – Jun. 2000 PJ, I. Tertial, Abteilung für Kardiologie Krankenhaus Necker in Paris, Frankreich
- Jun. 2000 – Jul. 2000 PJ, I. Tertial, II. Medizinischen Klinik, Technische Universität München, Klinikum Rechts der Isar, München
- Aug. 2000 - Sep. 2000 PJ, II. Tertial, Abteilung für Viszeral- und Thoraxchirurgie am Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, USA
- Okt. 2000 – Nov. 2000 PJ, II. Tertial, Abteilung für Neurochirurgie, Brigham & Women's Hospital und Children's Hospital, Harvard University, Boston, USA
- Dez. 2000 – Mär. 2001 PJ, III. Tertial, Frauenklinik, Technische Universität München, Klinikum Rechts der Isar, München
- Nov. 1996 - Jul. 1997 Evaluation von Verletzungsmustern bei Verkehrsunfällen, Medizinische Abteilung, Gesamtverband der

Schadensversicherer GdV, München

Aug. 1998 - Dez. 1999 Assistenz Schlaflabor, Abteilung für Psychatrie, Klinikums  
Rechts der Isar, München

*ÄIP*

Juni 01 – Okt. 01 Klinikum Großhadern, Frauenklinik, Onkologische Tagesklinik

Nov. 01 – Jan. 02 Klinikum Großhadern, Frauenklinik, präpartale Station I4 und  
Wöchnerinnenstation H10

Feb. 02 – Nov.02 Klinikum Großhadern, Frauenklinik, Operative Privatstation  
I21

*Assistenzärztin*

Dez. 02 – Mär.03 Vollapprobation 01.12.2002

Klinikum Großhadern, Frauenklinik, Operative Privatstation  
I21

April03 – Nov. 04 Klinikum Großhadern, Frauenklinik, Operative  
Allgemeinstation I5

Seit Dez. 04 Klinikum Großhadern, Frauenklinik, Kreissaalteam

*Wissenschaftliche  
Tätigkeit*

Mitglied der Forschungsprojektgruppe Mammakarzinom  
der Frauenklinik, Klinikum Großhadern

Mitglied der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und  
Geburtshilfe

Mitglied der Projektgruppe Mammakarzinom des  
Tumorzentrum der LMU München und der Technischen  
Universität München

*Veröffentlichungen*

Kahlert S, **Himsli I**, Bauerfeind I: Axillary staging in patients  
with ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast.  
Breast Cancer Research and Treatment 2004; 88(1):41

Untch M, **Himsli I**, Kahlert S, Lueck HJ, Eidtmann H, Du Bois  
A, Meerpohl HG, Thomssen C, Harbeck N, Jackisch C,  
Kreienberg R, Emons G, Wallwiener D, Wiese W, Schaller G,

Kuhn W, Muscholl M, Pauschinger M, Langer B:  
Anthracycline and trastuzumab in breast cancer treatment.  
Oncology 2004; 18(14): 59-64

**Himsl I**, Bauerfeind I, Sorokina Y, Kahlert S, Untch M: Ist die  
Sentinel Lymphknotenentfernung beim duktalem Carcinoma in  
situ indiziert?  
Abstract, DGS Jahrestagung 2004

Bauerfeind I, **Himsl I**, Kahlert S, Untch M: Die  
Sentinellymphknotenentfernung beim Mammakarzinom -  
derzeitiger Stand.  
In: „Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms“, Untch  
M, Sittek H, Bauerfeind I, Reiser M, Hepp H (Hrsg.), 4.  
Auflage, Zuckschwerdt Verlag 2004; 261-274

Bauerfeind I, **Himsl I**, Kuhn T, Untch M, Hepp H: Sentinel  
lymph node biopsy in breast cancer: state of the art.  
Gynäkol Geburtshilfliche Rundsch 2004; 44(2): 84-91

Bauerfeind, **Himsl I**, Kahlert S, Linke R, Lebeau A, Untch M,  
Hepp H: Sentinellymphknotenuntersuchung beim  
Mammakarzinom: Aktueller Stand.  
Gynäkologe 2005; 38(3): 217 - 229

**Himsl I**, Bauerfeind I, Kahlert S, Untch M: Ist die Sentinel  
Lymphknotenentfernung beim duktalem Carcinoma in situ  
indiziert?  
Abstract, OEGGG&BGGG Jahrestagung 2005

**Himsl I**, Bauerfeind I, Lenhard M, Kahlert S, Sittek H, Linke  
R, Mayr D, Untch M: Positive Sentinel Node Biopsie bei  
einem Rezidiv eines duktalem Carcinoma in situ mit



belgeitender invasiver Tumorkomponente (Mikroinvasion).  
Geburtsh Frauenheilk 2005; 65: 625-628

Bauerfeind I, **Himsl I**, Löhrs B, Fischer M, Kahlert S, Sittek H,  
Lebeau A, Untch M, Hepp H: Operation nach primär  
systemischer Therapie des Mammakarzinoms.  
Gynäkologe 2005; 38(3): 193–200

Bauerfeind I, **Himsl I**, Stöckl D, Untch M: Bedeutung des non-  
Sentinel-Lymphknoten beim Mammakarzinom. Gynäkologe  
2005; 38: 885-896

**Himsl I**, Bauerfeind I, Kahlert S, Sorokina Y, Lenhard M,  
Untch M, Kühn T: Indikationen zur Sentinel-  
Lymphknotenentfernung (engl.: sentinel node biopsy = SNB)  
beim Mammakarzinom  
Gynäkologe 2005; 38: 869-876

Bauerfeind I, **Himsl I**, Rühl I: Mondor´s disease after bilateral  
axillary node biopsy. Arch Gynecol Obstet 2006; 273:374-377

**Himsl I**, Bauerfeind I, Lenhard M, Strauss A: Operative  
Therapie benigner Mammatumore: Aktueller Stand.  
Gyn 2006; in press

Lenhard SM, Untch M, **Himsl I**, Ditsch N, Bittmann I, Friese  
K, Bauerfeind I: The high-grade endometrial sarcoma: a rare  
entity. Arch Gynecol Obstet. 2006; 274(1):56-59.

München, den 28. Juni 2006

Isabelle Himsl

## 9.2 Danksagung

Die Mithilfe zahlreicher Freunde, Kollegen und Bekannter ermöglichte erst die Fertigstellung dieser Arbeit. In diesem Abschnitt möchte ich die Gelegenheit wahrnehmen, mich für die mir entgegengebrachte freundliche Unterstützung und Hilfe zu bedanken.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. E. Biemer, Direktor der Abteilung für Plastische und Wiederherstellungschirurgie an der Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar, danke ich für die Überlassung des Themas, des Arbeitsplatzes und seine stets gewährte Unterstützung.

Ebenso möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher, Direktor des Institutes für experimentelle und onkologische Therapieforschung an der Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar, für die Bereitstellung der Labor- und Operationsräume sowie der nötigen Arbeitsmaterialien danken.

Mein besonderer Dank gebührt meinem Betreuer, Herrn PD Dr. med. M. Geishauser, der mir während der gesamten Durchführung dieser Arbeit mit Erfahrung, konstruktiven Impulsen und freundschaftlichem, kritischem Ansporn zur Seite stand.

Ebenso möchte ich Frau Claudia Ocampo und Herrn Dr. med. Nguyen The Hoang danken, die mich vor allem in der Anfangsphase der Arbeit zusammen mit Herrn Dr. med. M. Geishauser in die Operationstechnik und die mit dieser Arbeit verbundene experimentelle Methodik einführten.

Ich danke weiterhin allen Mitarbeitern des Instituts für experimentelle Onkologie und Therapieforschung, insbesondere den tierärztlichen Betreuern dieser Arbeit, Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. W. Erhard, Frau PD Dr. med. vet. J. Henke und Herrn PD Dr. med. vet. T. Brill, den OP-Schwestern, allen Tierpflegern für die gute Betreuung der Versuchstiere, den Fotografen für ihre Hilfe bei der Dokumentation.

Frau Dr. med. vet. M.-L. Schmeller, Frau Dr. med. vet. K. Herfeld und Frau Heinze danke ich für ihre Hilfe bei der Herstellung der histologischen Aufnahmen und deren histopathologischer Auswertung.

Ich danke Herrn Univ. Prof. Dr. Alt und seiner kardiologischen Projektgruppe für deren freundliche Überlassung der Software und des Computerarbeitsplatzes zur Anfertigung der planimetrischen Auswertung der Haut und die Einführung in diese Messtechnik.

Herrn Schmal, Abteilung Computer Graphik und Design der Chirurgie, danke ich für die spontane und zeitaufwendige Unterstützung bei der elektronischen Aufarbeitung der Daten.

Ebenso möchte ich mich herzlich bei Herrn Dr. med. Staudenmayer (HNO, Klinikum Großhadern), Herrn Dipl. rer. nat. Aigner und Frau Lempart bedanken für die Bereitstellung der Gerätschaften zur Anfertigung der immunhistochemischen Präparate und dem mir entgegengebrachten konstruktiven Engagement.

Mein Dank gilt ebenfalls Frau Dr. med. Kloth, Klinikum Regensburg, für die großzügige Bereitstellung der Antikörperseren im Rahmen der immunhistochemischen Auswertung.

Frau Dipl. math. R. Busch und Herrn Priv. Doz. Dr. med. vet. O. Petrovich danke ich für die mathematische Konzeption dieser Arbeit und die präzise statistische Auswertung der ermittelten Daten.

An dieser Stelle möchte ich mich auch im Besonderen bei meinem Partner und Kollegen, Dr. med. Christian Tudor für seine langjährige Unterstützung und seine stets wertvollen Anregungen herzlich bedanken.

Mein tiefster Dank aber gilt meinen Eltern, die durch ihr hohes Maß an mir entgegengebrachtem Verständnis und nicht zuletzt finanzieller Unterstützung erst meinen Werdegang und auch diese ihnen gewidmete Promotionsarbeit ermöglicht haben.