

## 4 Ergebnisse

## 4.1 Ergebnisse des Vorversuchs

Tabelle drei: Übersicht zur Operationstechnik und der Durchgängigkeit der Gefäßanastomosen im Vorversuch.

<b>Tier</b>	<b>Operations- technik</b>	<b>Anastomose post operationem</b>	<b>Anastomose bei Versuchsende</b>	<b>Bemerkungen</b>
<b>1</b>	freies Transplantat	entfällt	entfällt	
<b>2</b>	gefäßgestielter Tibialappen	Pulsationen sichtbar	∅	Verstorben am 2. Tag post
<b>3</b>	Mikrochir. Transplantat	Pulsationen sichtbar	Pulsation fraglich	
<b>4</b>	freies Transplantat	entfällt	entfällt	
<b>5</b>	Mikrochir. Transplantat	Pulsationen kräftig	Pulsationen kräftig	
<b>6</b>	gefäßgestielter Tibialappen	Pulsation fraglich	keine Pulsationen	
<b>7</b>	Mikrochir. Transplantat	Pulsationen kräftig	Pulsationen kräftig	
<b>8</b>	Mikrochir. Transplantat	Pulsationen kräftig	Pulsationen kräftig	
<b>9</b>	gefäßgestielter Tibialappen	Pulsation fraglich	keine Pulsationen	

Tier 1: Postoperativ gestaltete sich der Verlauf komplikationslos. Zum Opferungszeitpunkt liegt sowohl aktiv als auch passiv eine freie Beweglichkeit bei reizlosen Wundverhältnissen in beiden Kniegelenken vor. Im rechten Kniegelenk erreicht das Ersatzgewebe das Niveau des Umgebungsknorpels, hat eine weiße Farbe, ist jedoch an der Oberfläche grober strukturiert als dieser. In der Konsistenz ist es dem Gelenkflächenknorpel gleich. Randspalten sind im Transplantatbereich makroskopisch nicht erkennbar. Das linke Kniegelenk zeigt keine morphologischen Veränderungen.

Tier 2: Am zweiten postoperativen Tag zeigt sich eine breite Dehiszenz der Operationswunde des rechten Kniegelenkes. Bei der Revision kommt das Tier ad exitum. Es wird von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen.

Tier 3: Der Verlauf wird durch einen Kniegelenkerguss rechts kompliziert, der am 14. postoperativen Tag abpunktiert wird. Es handelt sich um 4ml blutig-tingierte, seröse Flüssigkeit. Der weitere Verlauf ist komplikationslos. Beide Kniegelenke sind aktiv und passiv frei bewegen. Das Ersatzgewebe erreicht das Gelenkflächenniveau, im lateralen Defektbereich sind deutliche Randspalten sichtbar. Die Oberfläche des gesamten Gleitlagers ist leicht strukturiert und von weißer Farbe. Die Konsistenz des Ersatzgewebes unterscheidet sich nicht vom umgebenden Gelenkknorpel. Am linken Kniegelenk sind keine morphologischen Veränderungen nachweisbar.

Tier 4: Postoperativ zeigt sich ein komplikationsloser Verlauf. Klinisch zeigt sich freie Beweglichkeit beider Kniegelenke. Am rechten Kniegelenk wurde das Gleitlager bis in das Niveau des Gelenkknorpels vollständig rekonstruiert. Die ursprünglichen Defektränder sind aufgrund einer partiellen Bindung an den Gelenkknorpel deutlich sichtbar. In seiner Konsistenz ist das Regenerat deutlich herabgesetzt und von weißer Farbe. Das übrige Gleitlager weist eine glatte, glänzende und insgesamt unauffällige Oberfläche auf. Das linke Kniegelenk ist inspektorisch unauffällig.

Tier 5: Postoperativ gestaltete sich der Verlauf komplikationslos. Beide Kniegelenke sind am Versuchsende sowohl aktiv als auch passiv uneingeschränkt beweglich. Der Defekt des femoropatellaren Gleitlagers des rechten Knie-

gelenkes ist durch das Regenerat vollständig restauriert. Die Oberfläche ist weiß und spiegelnd glatt, die Konsistenz entspricht der von Gelenkknorpel. Eine deutliche Adhärenz des Transplantatgewebes zum Umgebungsknorpel ist gegeben. Das linke Kniegelenk zeigt keine morphologischen Veränderungen.

Tier 6: Der Heilungsverlauf kompliziert sich durch eine Wunddehiszenz am rechten Kniegelenk, die am fünften postoperativen Tag nach ausgiebiger Spülung mit Wasserstoffperoxid (3%ige Lösung) durch erneute Naht verschlossen wird. Im weiteren Verlauf zeigen sich reizlose Wundverhältnisse an beiden Kniegelenken und keine Funktionseinschränkung des Gelenkapparates. Der Patellagleitbahndefekt ist durch das Ersatzgewebe vollständig ausgefüllt, Randspalten sind nicht sichtbar. Die Konsistenz und die Farbe des Ersatzgewebes unterscheiden sich nicht vom umgebenden Gelenkknorpel. Am linken Kniegelenk sind keine morphologischen Veränderungen nachweisbar.

Tier 7: Am 9. postoperative Tag zeigt sich eine kleine Wunddehiszenz am rechten Kniegelenk. Es erfolgt tägliche Spülung mit verdünnter Wasserstoffperoxidlösung und täglicher Verbandwechsel bis zum 14. postoperativen Tag. Der weitere Verlauf ist komplikationslos. Klinisch zeigt sich freie Beweglichkeit in beiden Gelenken. Das neu gebildete Gewebe unterscheidet sich weder farblich noch in der Konsistenz von Gelenkknorpel. Der Defekt ist bis in das Gelenkknorpelniveau vorzüglich restauriert, es bestehen keine Randspalten. Palpatologisch erscheint das Ersatzgewebe derber als Gelenkknorpel. Das linke Kniegelenk zeigt keine morphologischen Veränderungen.

Tier 8: Postoperativ ungestörte Wundheilung, dennoch zeigt sich rechts eine Bewegungseinschränkung im Vergleich zur Gegenseite, welche klinisch als auffällig zu werten ist. Morphologisch findet sich im Bereich der Gleitbahn des rechten Kniegelenkes eine tiefe, über den ursprünglichen Defekt hinausgehende Zerstörung des Gelenkknorpels, welche bis in den darunterliegenden Knochen reicht. Das Transplantat ist zerstört, die Defektränder sind mottenfraßähnlich verändert. Für biochemische Untersuchungen kann kein Gewebe entnommen werden. Am linken Kniegelenk sind keine morphologischen Veränderungen nachweisbar.

Tier 9: Postoperativ ist der Verlauf komplikationslos. Klinisch zeigt sich freie Beweglichkeit in beiden Kniegelenken. Das neu gebildete Gewebe unterscheidet sich weder farblich noch in der Konsistenz von Gelenkknorpel. Der Defekt ist nach allen Richtungen vollständig restauriert. Das linke Kniegelenk zeigt morphologisch keine Veränderungen.

## 4.2 Ergebnisse des Hauptversuchs

### 4.2.1 Postoperativer Verlauf

Im Hauptversuch sind keine postoperativen Todesfälle zu verzeichnen. Bei allen Tieren werden noch am Operationstag Spontanbewegung und Nahrungsaufnahme beobachtet. Wundheilungsstörungen treten in 3 Fällen auf und werden mit Lokalmaßnahmen (Wundreinigung mit Wasserstoffperoxid 3%, Touchierung mit Betaisodona und täglicher Verbandwechsel) innerhalb von vierzehn Tagen beherrscht. Ein operativer Revisionseingriff ist in keinem Fall erforderlich. Die Entfernung des Nahtmaterials erfolgt bei allen Tieren am zehnten postoperativen Tag.

### 4.2.2 Wassergehalt der Gewebeproben

In der Kontrollgruppe beträgt der durchschnittliche Wassergehalt  $66,8\% \pm 1,36$ . Bei den freien Transplantaten wird ein durchschnittlicher Wert von  $74,2\% \pm 2,8$  erreicht und bei den gefäßgestielten Transplantaten ein Wassergehalt von  $72,3\% \pm 1,46$ . Zur graphischen Darstellung siehe Abbildung fünf, Seite 37. In der statistischen Analyse zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen (T-Test für verbundene Stichproben; Kontrollgruppe → freie Transplantate:  $p=0,46$ ; Kontrollgruppe → gefäßgestielte Transplantate:  $p=0,19$ ; freie Transplantate → gefäßgestielte Transplantate:  $p=0,53$ ) (Messwerte siehe Anlagen).

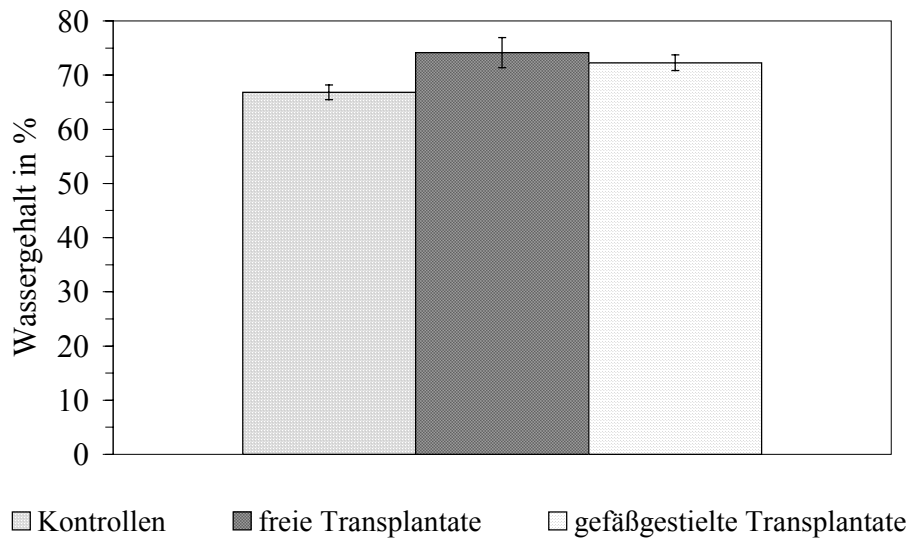


Abbildung fünf: Wassergehalt der Kniegelenksproben in Abhängigkeit von der Operationsmethode.

#### 4.2.3 Gesamtkollagengehalt der Gewebeproben

Der durchschnittliche Gesamtkollagengehalt der Kontrollgruppe beträgt  $61,2\% \pm 1,82$ , bei den gefäßgestielten Transplantaten  $65,4\% \pm 5,03$  und bei den freien Transplantaten  $51,8\% \pm 2,37$ ; siehe Abbildung sechs.

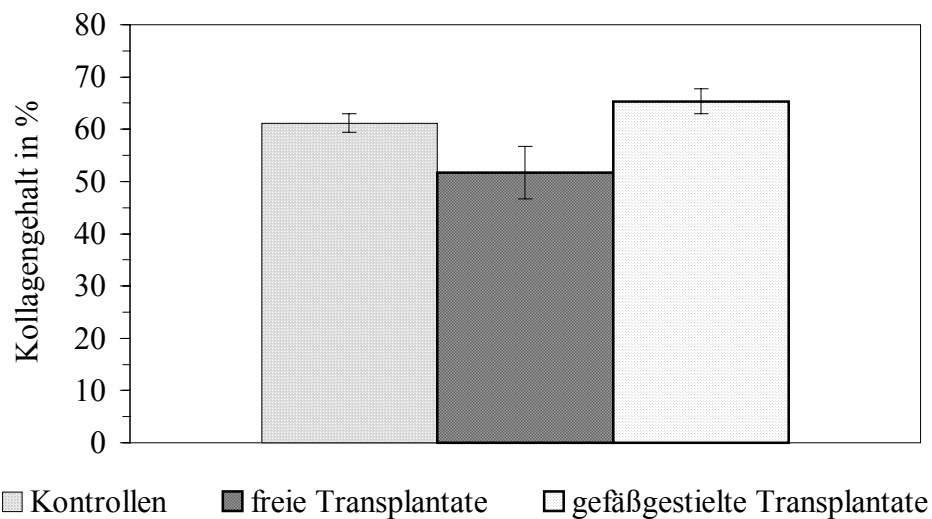


Abbildung sechs: Kollagengehalt der Kniegelenksproben in Abhängigkeit von der Operationsmethode.

Im Vergleich beider Transplantatgruppen zeigen sich die Unterschiede zwischen der Kontroll- und den beiden Transplantatgruppen als nicht signifikant (T-Test für verbundene Stichproben; Kontrollgruppe → freie Transplantate:  $p=0,14$ ; Kontrollgruppe → gefäßgestielte Transplantate:  $p=0,11$ ). Dahingegen findet sich im direkten Vergleich beider Transplantatgruppen ein signifikanter Unterschied (freie Transplantate → gefäßgestielte Transplantate:  $p=0,01$ ).

#### 4.2.4 Makroskopische Ergebnisse

Ein pannusartiger Überzug wird in keinem Präparat gefunden. Osteophyten sind auch nicht nachweisbar. Alle Präparate der Kontrollgruppe stellen sich mit spiegelnd glatter Oberfläche dar. Unregelmäßigkeiten der Oberfläche, Konsistenzminderungen oder Oberflächenveränderungen im Sinne von Fissuren und Kratern finden sich in dieser Gruppe nicht.



Abbildung sieben: Makroskopische Darstellung des patellaren Gleitlagers von Kaninchenkniegelenken 6 Monate post operationem. Links die Kontrollgruppe, in der Mitte die Gruppe, deren Defekte mit freien Periosttransplantaten versorgt wurden und rechts die Gruppe, deren Defekte mit mikrovaskulär reanastomosierte Transplantaten versorgt wurden.

Eine unauffällige, spiegelnd glatte Oberfläche, wird in der Gruppe der freien Transplantate (Gruppe 2) in nur einem von acht Präparaten, bei den gefäßgestielten Transplantaten (Gruppe 3) in zwei von elf Regeneraten erreicht. Angedeutete Unregelmäßigkeiten im Oberflächenbereich finden sich in Gruppe 2 bei einem Präparat, wobei das Ersatzgewebe das Niveau des Umgebungsknorpels erreicht und Randspalten nicht nachzuweisen sind. Dieses Ergebnis wird in Gruppe 3 in fünf von elf Präparaten erreicht. Der Hälfte der Präparate aus Gruppe 2 zeigt im Transplantatbereich eine mäßige Konsistenzminderung, angedeutete Randspalten und mäßige Unebenheiten der Oberfläche. In Gruppe 3 ist dies bei zwei von elf Transplantaten der Fall. Starke Oberflächenveränderungen mit ausgeprägtem Randspalt finden sich in Gruppe 2 in  $\frac{1}{4}$  der Fälle, Gruppe 3 in zwei von elf Regeneraten. Klinische Bilder siehe Abbildung sieben auf Seite 38.

Zum Zeitpunkt des Versuchsendes sind bei allen Gefäßanastomosen Pulsationen der Arterien nachweisbar. Beurteilt werden die distalen Gefäßanteile direkt vor Einmündung in das Regenerat.

Die Durchgängigkeit der reanastomosierten Gefäße ist damit gegeben.

#### 4.2.5 Histologische Ergebnisse

Art des prädominierenden Gewebes im Defekt

##### a.) Histomorphologie

Hyalinähnlicher Knorpel in typischer Schichtung findet sich in 16 von 19 Präparaten der Kontrollgruppe, zwei Präparate sind bei der histologischen Aufbereitung zerstört worden. Lediglich in einem Präparat stellte sich die Gelenkfläche als fibröses Gewebe dar.

In der Gruppe der freien Transplantate (Gruppe 2) kann in zwei von insgesamt acht Defekten hyalinähnlicher Knorpel, jedoch ohne typische Schichtung im Regenerat nachgewiesen werden. In sechs Präparaten herrscht fibröses Gewebe oder Knochen vor. Zur graphischen Darstellung siehe Abbildung acht, Seite 40.

Dieses Gewebe wird in den gefäßgestielten Transplantaten (Gruppe 3) lediglich zweimal bei insgesamt elf Präparaten gefunden. In einem Fall bildet sich inkomplett differenziertes mesenchymales Gewebe. Durch hyalinähnlichen Knorpel ohne typische Schichtung wird ein Transplantat im Gelenkflächenbereich ersetzt. In vier weiteren Fällen bildet sich hyalinähnlicher Knorpel in typischer Schichtung in Richtung zur Gelenkfläche hin. Unterhalb des Gelenkflächenbereichs findet sich bei allen Defekten der Gruppe 3 eine starke Schicht Bindegewebe. Zum basalen Knochen hin kann eine Verknöcherungstendenz im Sinne einer enchondralen Ossifikation bei den Präparaten gefunden werden, die hyalinähnlichen Knorpel bilden.

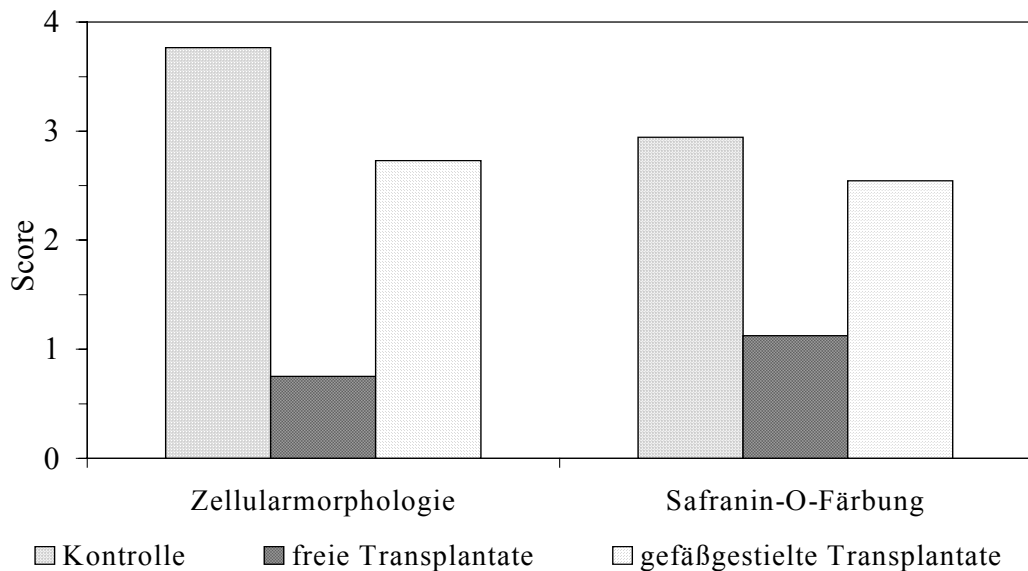


Abbildung acht: Wertigkeit morphologischer Parameter von Kniegelenksproben in Abhängigkeit von der Transplantationsmethode.

#### b.) Safranin-O-Färbung der Matrix

Die Safranin-O-Anfärbbarkeit der Matrix war in 16 Präparaten der Kontrollgruppe normal oder annähernd normal, in einem Präparat leicht vermindert.

Eine normale Anfärbung kann in Gruppe 2 in keinem Defekt gefunden werden. Zweimal ist die Färbbarkeit leicht vermindert. Der Hauptteil der Regenerate in



dieser Gruppe zeigt eine stark verminderte Färbung (in fünf von acht Präparaten). In einem Fall läßt sich keine Anfärbung erzielen.

In Gruppe 3 färbt sich das Gewebe aus sechs Defekten in der Safranin-O-Färbung normal an. Weitere fünf Präparate dieser Gruppe stellen sich mit leicht verminderter Anfärbbarkeit dar.

### Strukturelle Charakteristika des neugebildeten Gewebes

#### a.) Oberflächenbeschaffenheit

Schwerste Spaltbildungen oder Fibrillationen werden in der Kontrollgruppe nicht beobachtet. In zwei Präparaten finden sich Fissuren im Knorpel bis zu 25% der Schichtdicke. Ein Gelenkbereich weist oberflächliche, horizontale Laminationen auf. In allen weiteren Fällen dieser Gruppe (14 Präparate) finden sich glatte und intakte Oberflächen.

Dieses Ergebnis wird in der Gruppe der freien Transplantate nur einmal gefunden. In zwei weiteren Regeneraten zeigen sich im Gelenkflächenbereich Fibrillationen und horizontale Laminationen. In einem Defektbereich können Fissuren bis zu 25% der Schichtdicke festgestellt werden. In der Hälfte der Präparate dieser Gruppe finden sich schwerste Spaltbildungen oder Fibrillationen, welche in der Gruppe der gefäßgestielten Transplantate nicht gefunden werden.

In Gruppe 3 können Fissuren bis 25% der Schichtdicke nur einmal festgestellt werden. In vier weiteren Defekten stellen sich oberflächliche, horizontale Laminationen dar. Ansonsten ist die Gelenkfläche im Transplantatbereich bei allen weiteren Präparaten (insgesamt 6) glatt und intakt.

#### b.) Strukturelle Integrität

Die strukturelle Integrität des Gelenkflächenbereichs in der Kontrollgruppe konnte in 16 Fällen als normal eingeschätzt werden. In einem Präparat können leichte Spalten oder Zysten nachgewiesen werden. Schwere Desintegrationen finden sich in dieser Gruppe nicht.

Bei den freien Periostlappentransplantaten stellen sich jedoch zwei Präparate der regenerierten Gelenkflächen mit schweren Desintegrationen dar. In fünf Präparaten dieser Gruppe können leichte Spalten oder Zysten gefunden werden. Nur ein Präparat kann strukturell als normal gewertet werden.

Schwere Desintegrationen im neugebildeten Gewebe können in Gruppe 3 nicht nachgewiesen werden. Inhomogenitäten in Form von leichten Spalten oder Zysten treten in fünf Fällen auf. Die restlichen sechs Regenerate stellen sich im histologischen Bild strukturell als normal dar.

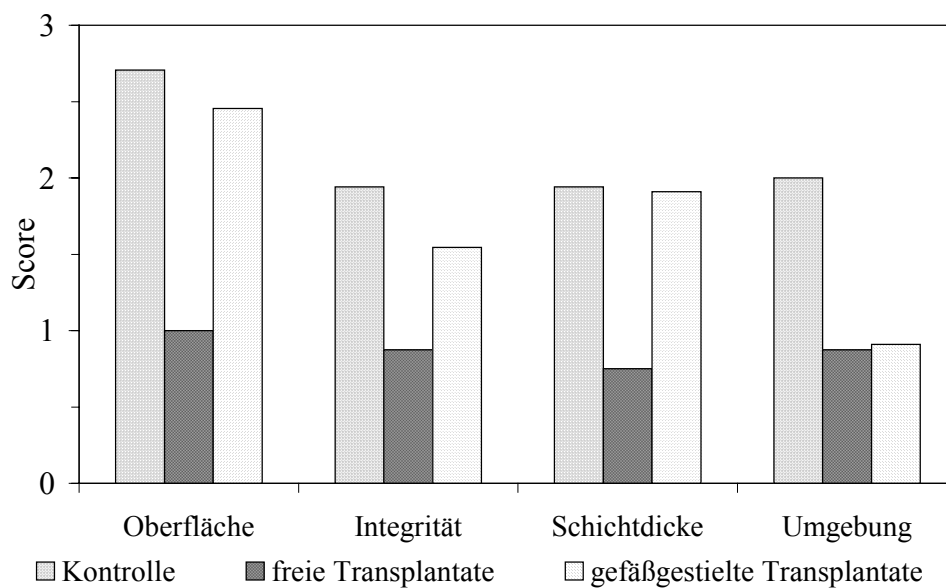


Abbildung neun: Wertigkeit struktureller Charakteristika bei Regeneraten aus Kniegelenksproben in Abhängigkeit von der Transplantationsmethode.

#### c.) Schichtdicke im Vergleich zum Oberflächenniveau des Umgebungsknorpels

Die Schichtdicke des Gelenkknorpels der Kontrollgruppe erreicht in 16 Präparaten der Präparate über die ganze Breite 100%. In einem Präparat erreicht die Schichtdicke partiell einen Wert über 50%. Eine Degeneration bis auf eine Höhe von weniger als 50% tritt bei den Kontrollen nicht auf.

In Gruppe 2 findet sich jedoch bei drei Regeneraten Ersatzgewebe in einer Höhe bis 50%. In weiteren vier Fällen konnte ein Wert über 50% bezogen auf das

Gelenkflächenniveau des Umgebungsknorpels erreicht werden. Ein vollständiger Ersatz auf der gesamten Breite wird in Gruppe 2 einmal erreicht.

Bei den gefäßgestielten Transplantaten wird in zehn Fällen ein vollständiger Ersatz der gesamten Breite erreicht. Einmal kann das Gelenkflächenniveau nur bis in eine Höhe von über 50% aufgebaut werden. Werte unterhalb von 50% treten hier nicht auf.

#### d.) Bindung zum Umgebungsknorpel

In den Gelenkflächen der Kontrollgruppe ist die Bindung zum Umgebungsknorpel an beiden Seiten komplett. Zur weiteren Auswertung wird allen Präparaten die volle Punktzahl gegeben.

Bei den freien Transplantaten kann in zwei Fällen keine Bindung des Regenerates an den Umgebungsknorpel erreicht werden. In weiteren fünf gesetzten Defekten ist diese Bindung entweder komplett an einer Seite oder partiell an beiden Seiten vorhanden. Eine komplette Bindung an beiden Seiten wird in dieser Gruppe einmal erreicht, in Gruppe 3 zweimal.

Eine einseitig vollständige oder beidseitig partielle Verbindung des neugebildeten Knorpelgewebes aus den Tieren der Gruppe 3 kann in sechs Präparaten beobachtet werden. Keine seitliche Bindung findet sich bei 3 Präparaten in dieser Gruppe.

Eine Übersicht zu den Bewertungen der strukturellen Charakteristika findet sich in Abbildung neun, Seite 42.

#### Zelluläre Veränderungen im neugebildeten Gewebe

##### a.) Zellzahl

Die Zellzahl ist bei 16 Präparaten der Kontrollgruppe unauffällig und kann daher als normal gewertet werden. In einem Fall wird eine diskrete Hyperzellularität beobachtet. Weitere Veränderungen werden nicht gefunden.

Bei dem Regenerationsgewebe der Transplantationsdefekte aus Gruppe 2 ist in einem Fall mit schwerste Hypo- bis Azellularität zu beobachten, weitere vier Präparate dieser Gruppe zeigen Veränderungen im Sinne einer mäßigen

Hypozellularität, welche in den Regeneraten der gefäßgestielten Transplantate einmal gefunden wird.

Eine mäßige Hyperzellularität wird bei den freien Transplantaten in 2 Fällen und bei den gefäßgestielten Transplantationsdefekten in 9 Fällen beobachtet. Es bilden sich die säulenartigen Anordnungen der Chondrozyten im gelenkflächennahen Knorpelgewebe aus; die streng radiäre Ausrichtung dieser Säulen fehlt jedoch. Auch die für den hyalinen Knorpel typischen zellfreien Höfe können nur vereinzelt gefunden werden.

In beiden Transplantatgruppen können morphologisch veränderte Chondrozyten nachgewiesen werden, die sich in einer Schicht sowohl oval als auch rund und in unterschiedlicher Größe darstellen. Ein histologisch unauffälliges Zellbild kann nur einmal in Gruppe 3 und einmal in Gruppe 2 gefunden werden.

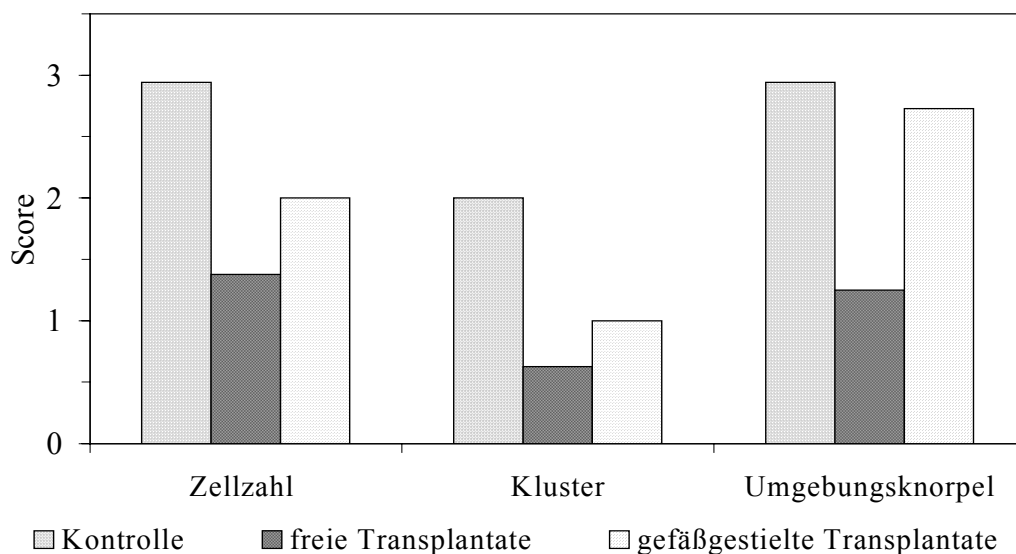


Abbildung zehn: Wertigkeit zellulärer und degenerativer Veränderungen bei Regeneraten aus Kniegelenksproben in Abhängigkeit von der Transplantationsmethode.

#### b.) Chondrozytencluster

In den Präparaten der Kontrollgruppe konnten keine Chondrozytencluster nachgewiesen werden. Bei den Defekten, die mit freien

Periostlappentransplantaten gedeckt werden, finden sich in fünf Präparaten Clusterbildungen, die bei weniger als 25% der Knorpelzellen auftreten.

In Gruppe 3 ist dies in allen Defekten der Fall. Clusterbildungen in mehr als 25% der Fälle können nur in der Gruppe der freien Transplantate bei drei Präparaten beobachtet werden.

#### Degenerative Veränderungen im Umgebungsknorpel

In 16 Kontrollgruppenpräparaten wird in den Gelenkflächenbereichen eine normale Zellularität und Anfärbung mit der Safranin-O-Färbung gefunden, nur ein Präparat zeigt einen mäßigen Färbbarkeitsverlust.

In Gruppe 2 fällt in einem Präparat schwerste Hypo- bis Azellularität auf. Eine Anfärbung mit Safranin-O ist in diesem Präparat nicht möglich. Die Hälfte der Präparate dieser Gruppe zeigt im Defektrandgebiet eine leichte bis mäßige Hypozellularität. In 3 Fällen kann der Umgebungsknorpel als normal gewertet werden; ein mäßiger Färbbarkeitsverlust mit Safranin-O ist hier jedoch auch zu verzeichnen.

Dieses Ergebnis kann auch bei den Regeneraten der gefäßgestielten Transplantate in drei Fällen gefunden werden. Weitere Degenerationen im defektnahen Knorpelbereich dieser Gruppe werden nicht gefunden. In weiteren acht Präparaten dieser Gruppe zeigt sich ein normales Färbungsverhalten in der Safranin-O-Färbung; histologisch stellt sich das Knorpelgewebe ohne Cluster mit normaler Zellularität dar.

#### Histologischer Score

In der Gesamtdarstellung aller genannten histologischen Merkmale zeigen sich die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen sehr deutlich. Zur graphischen Darstellung siehe Abbildung 11f, Seite 46.

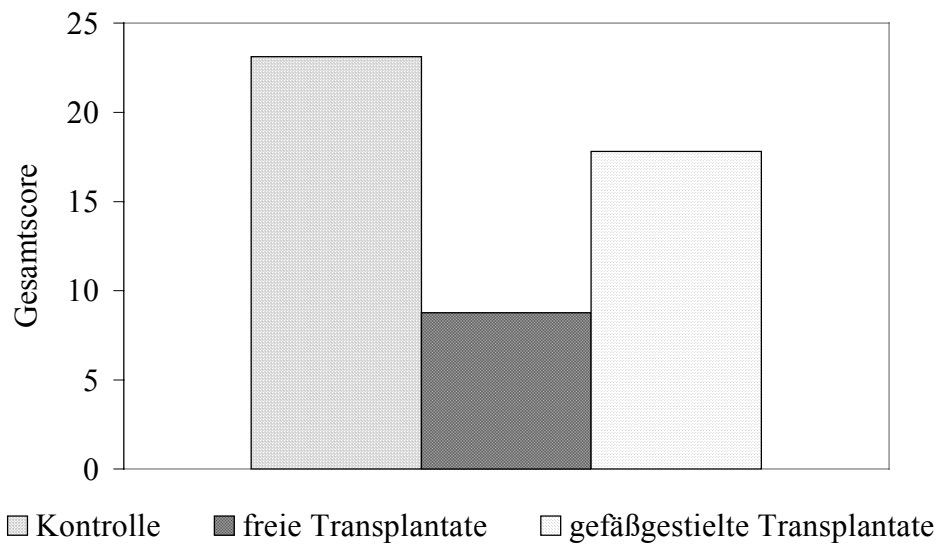


Abbildung elf: Wertigkeit sämtlicher histologischer Parameter bei Regeneraten aus Kniegelenksproben in Abhängigkeit von der Transplantationsmethode.