

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Allgemeine Orthopädie
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. Winkelmann -

**Die Rolle von VEGF in der Entwicklung der experimentell
induzierten Arthrose im Kaninchenmodell**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Bertram, Sabine, geb. Seidensticker

aus Köln

2005

Gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Heribert Jürgens

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Susanne Fuchs

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Horst Rieger

Tag der mündlichen Prüfung: 19.09.2005

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Allgemeine Orthopädie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. Winkelmann-

Referent: Prof. Dr. med. Susanne Fuchs

Koreferent: Prof. Dr. med. Horst Rieger

ZUSAMMENFASSUNG

Die Rolle von VEGF in der Entwicklung der experimentell induzierten Arthrose im Kaninchenmodell

Bertram, Sabine

Einleitung: Vorangegangene Studien legen eine Beteiligung von VEGF an der Pathogenese der Arthrose nahe. Über die Rolle dieses Zytokins in der Frühphase der Arthroseentwicklung ist bisher jedoch nur wenig bekannt.

Ziel der vorliegenden Studie war die Untersuchung der Frage, welche Rolle VEGF in der Entwicklung einer experimentell induzierten Arthrose am Kaninchengelenk spielt.

Methode: 12 ausgewachsenen Neuseelandkaninchen wurde das vordere Kreuzband reseziert, 12 weitere erhielten lediglich eine Scheinoperation, bei der das Kniegelenk eröffnet, gespült und wieder verschlossen wurde. Aus beiden Gruppen wurden jeweils nach 3, 6 und 12 Wochen je 4 Tiere getötet und die Kniegelenke entnommen. 4 weitere Tiere wurden ohne vorherige Operation getötet und die Kniegelenke entnommen. Alle Gelenke wurden in Hinblick auf makroskopische Zeichen einer Arthroseentwicklung untersucht sowie mikroskopisch mit Hilfe des Mankin-Score beurteilt. Des Weiteren erfolgte eine immunhistochemische Anfärbung der VEGF-exprimierenden Zellen. Der Tierversuch (G 49/2000; AZ 23.0835.1.0) wurde am 25.07.2000 durch die Bezirksregierung Münster genehmigt.

Ergebnis: Nach Kreuzbanddurchtrennung konnte makroskopisch und histologisch eine Zunahme der Arthrosezeichen sowie immunhistochemisch eine Steigerung der VEGF-Expression nachgewiesen werden. Sowohl im Fall der Versuchs- wie auch der Kontrollgruppe korrelierte der makroskopische Arthrosegrad signifikant und positiv mit der seit der Operation vergangenen Zeit ($r = 0,52$, $p < 0,05$). Insgesamt lag jeweils eine signifikante, positive Korrelation zwischen dem makroskopischen und histologischen Arthrosegrad ($r = 0,750$, $p < 0,01$), zwischen der VEGF-Expression und dem histologischen Arthrosegrad ($r = 0,767$, $p < 0,01$) sowie zwischen der VEGF-Expression und dem makroskopischen Arthrosegrad ($r = 0,518$, $p < 0,02$) vor. Gelenke mit deutlicher Osteophytenbildung wiesen eine signifikant gesteigerte VEGF-Expression auf.

Schlussfolgerung: Diese Studie zeigt eine Steigerung der VEGF-exprimierenden Chondrozyten im zeitlichen Verlauf. Da zusätzlich auch ein enger Zusammenhang mit den makroskopisch und histologisch nachweisbaren Knorpelveränderungen besteht, ist eine wichtige Rolle von VEGF in der Frühphase der Arthroseentwicklung anzunehmen.

Tag der mündlichen Prüfung: 19.09.2005

Meiner Familie in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Der hyaline Gelenkknorpel	8
1.2	Arthrose	9
1.2.1	Ätiologie	10
1.2.2	Pathogenese	11
1.2.3	Epidemiologie und sozialökonomische Bedeutung	16
1.2.4	Therapie	16
1.3	VEGF	18
1.4	VEGF und Arthrose	21
1.5	Fragestellung und Zielsetzung	23
2	Material und Methode	25
2.1	Versuchsaufbau	25
2.2	Tiermodell	26
2.3	Operationsmethode	27
2.4	Probenentnahme und Aufbereitung der Proben	30
2.4.1	Makroskopische Beurteilung	30
2.4.2	Gewinnung der histologischen Schnitte	31
2.4.3	Färbeverfahren	32
2.4.3.1	Hämatoxyllin-Eosin-Färbung (HE)	32
2.4.3.2	Safranin-O-Färbung	33
2.4.3.3	Immunhistochemische Färbung VEGF	33
2.5	Histologische Beurteilung	34

2.6	Digitale Dokumentation und Bildanalyse	36
2.7	Statistik	36
3	Ergebnisse	38
3.1	Makroskopische Ergebnisse	39
3.1.1	Ulzeration des Knorpels	39
3.1.2	Osteophyten	40
3.1.3	Ergussbildung	43
3.1.4	Makroskopischer Arthrosegrad	44
3.2	Proteoglykanverlust	45
3.3	Histologischer Arthrosegrad	49
3.4	Immunhistochemische Färbung VEGF	54
3.4.1	Kontrollen	54
3.4.2	Nachweis von VEGF	54
3.4.3	Regionale Verteilung der VEGF-Expression	60
4	Diskussion	61
4.1	Diskussion der Methodik	61
4.1.1	Tiermodellauswahl	61
4.1.2	Probenentnahme	62
4.2	Diskussion der Ergebnisse	63
4.2.1	Arthroseentstehung nach Kreuzbanddurchtrennung	63
4.2.2	VEGF	65

5	Zusammenfassung	71
6	Literaturverzeichnis	73
7	Abbildungsverzeichnis	82
8	Abkürzungsverzeichnis	85
9	Danksagung	86
10	Lebenslauf	87
11	Anhang	I
11.1	Makroskopische Befunde	I
11.2	Histologische Befunde	II
11.3	VEGF-Expression	V
11.4	Ergebnisse – Mittelwerte	IX
11.5	Ergebnisse – Korrelationskoeffizienten nach Spearman	X
11.6	Bescheid über die Genehmigung des Tierversuches	XI

1 Einleitung

1.1 Der hyaline Gelenkknorpel

Hyalines Knorpelgewebe ist die häufigste Knorpelart. Es kommt im menschlichen Körper als Gelenkknorpel, im Ansatz der Rippen am Brustbein, im Kehlkopf und in den Atemwegen sowie während des Längenwachstums in der Epiphysenfuge als Vorstufe des Knochens vor. Da der ausdifferenzierte Knorpel gefäß- und nervenfrei ist, erfolgt der Stoffwechsel mittels Diffusion vom gefäßhaltigen Perichondrium bzw. beim Gelenkknorpel von der Synovia aus. Der menschliche Gelenkknorpel besteht aus einer kleinen Zahl von Zellen, den Chondrozyten, die einzeln oder in Gruppen von 2-8 Zellen in so genannten Lakunen liegen. Diese Lakunen sind von ausgeprägter extrazellulärer Matrix umgeben, welche um die Knorpelzellen herum ein Territorium bildet. Chondrozyten und das sie umgebende Territorium bilden eine funktionelle Einheit, das Chondron, welches Umsatz und Wasseraustausch der extrazellulären Matrix reguliert. Hyaliner Knorpel besteht in den Interterritorien, den Gebieten zwischen den einzelnen Chondronen, zu 60-70% aus Wasser. Die verbleibende Trockensubstanz (30-40%) besteht etwa zu gleichen Teilen aus Kollagen und sauren Proteoglykanen. Die Mineralstoffe machen weniger als 10% aus [74]. An die Kernproteine der Proteoglykane sind fast ausschließlich Chondroitin- und Keratansulfate gebunden. Die Proteoglykane sind für die elastischen Eigenschaften des Knorpels verantwortlich, worauf die charakteristischen Eigenschaften des hyalinen Knorpels beruhen. Er ist nur wenig elastisch und zugfest, besitzt aber eine hohe Druckfestigkeit. Zwischen den Proteoglykanen liegen, an diese elektrostatisch gebunden, relativ dünne Kollagenfibrillen (aus Kollagen-Typ II und -Typ IV). Im Gelenkknorpel ziehen die in einer basalen, verkalkten Schicht verankerten Faserbündel zunächst senkrecht zur Knorpeloberfläche und biegen dann bogenförmig in einen oberflächen-parallelen Verlauf um [4]. Dies verhindert das Abgleiten des Knorpels bei Scherbewegungen. Die Stoffwechsellage des hyalinen Knorpels wird im Alter durch Wasserabnahme

und Rückgang des Chondroitinsulfats ungünstiger. Absterbende Zellen sind eine Zeit lang noch schattenhaft zu sehen und werden „verdämmernde Zellen“ genannt. In zentralen Bezirken kommt es stellenweise zur Demaskierung der Kollagenfasern (Asbestfaserung) und zur Höhlenbildung. In kleinen Bereichen treten Kalkeinlagerungen auf [36].

1.2 Arthrose

Die Arthrosis deformans ist ein sehr verbreitetes Leiden. Ihre Prävalenz nimmt mit steigendem Alter deutlich zu. Bereits um das 40. Lebensjahr finden sich bei der Hälfte der Bevölkerung erste, klinisch meist noch stumme, röntgenologische Hinweise auf degenerative Skelettveränderungen. Gemäß Schätzungen leben in Deutschland 8-10 Millionen Menschen mit einer Arthrose. Prinzipiell kann sich an jedem Gelenk des Körpers eine Arthrose entwickeln, wobei vornehmlich Wirbelsäule, Kniegelenk, Hüftgelenk und Schultergelenk betroffen sind. Die degenerativen Veränderungen der Wirbelsäule überwiegen die der Extremitätengelenke bei weitem. Unter den peripheren Gelenken steht die Erkrankungshäufigkeit des Kniegelenkes vor der des Hüft- und Schultergelenkes sowie der der Fingergelenke [8, 69].

Die Degeneration des Gelenks ist makroskopisch wie auch mikroskopisch erkennbar. Histologisch kommt es im hyalinen Knorpel zur Demaskierung der normalerweise nicht darstellbaren kollagenen Fasern. In diesen so veränderten Knorpelpartien entstehen meist Zysten, dort sind keine Zellen mehr nachweisbar. Diese Destruktion des Knorpelgewebes ist letztlich Ursache für die Abnahme der Scherfestigkeit des hyalinen Gelenkknorpels. Dadurch wird vermehrt Druck, der nicht mehr voll in Schub transformiert werden kann, auf den Knochen übertragen. Diese Druckeinwirkung stellt den Reiz für eine Knochenneubildung dar. Auf diesem Weg entstehen Hypertrophie der subchondralen Knochenspongiosa, Ossifikationsvorgänge im Gelenkknorpel selbst und Randexostosen, die den erkrankten Gelenken schließlich ihre charakteristische Struktur verleihen [72].

1.2.1 Ätiologie

Die Arthrosis deformans entwickelt sich stets aufgrund eines Missverhältnisses zwischen verminderter mechanischer Resistenz und erhöhter mechanischer Beanspruchung des Gelenkknorpels. Es gibt primäre (genuine, idiopathische) Arthrosen und solche, die sich sekundär als Folge einer den Knorpel schädigenden Noxe entwickeln (Sekundärarthrose). Bei den primären Arthrosen liegt eine Minderwertigkeit des Knorpelgewebes vor, deren Ursachen immer noch weitestgehend unbekannt sind. Es bestehen jedoch Hypothesen bezüglich genetischer Disposition, welche im Zusammenhang mit biomechanischen, alters- und geschlechtsabhängigen Faktoren zur Entstehung arthrotischer Erkrankungen führen soll. Sekundäre Arthrosen können auf dem Boden einiger bekannter Faktoren entstehen. Dazu gehören die Überlastung aufgrund von Übergewicht, Dysplasien, Achsenfehlern oder Versteifung benachbarter Gelenke, Traumen wie z. B. Bandrupturen, interartikuläre Frakturen oder Luxationen sowie entzündliche Gelenkprozesse. Ebenfalls ursächlich können Wachstumsstörungen (Epiphysenlösung der Hüfte), metabolische (Gicht) sowie endokrine Erkrankungen (Hypothyreose) sein. Das Alter an sich ist nicht als Ursache einer Arthrose anzusehen [8]. Einige Autoren stellen die Einteilung in primäre und sekundäre Arthrosen jedoch zunehmend in Frage. Sie halten die ätiologischen Faktoren in vielen Fällen für zu komplex und weitreichend, um eine klare Unterteilung zu rechtfertigen, sowie die Ätiologie der sekundären Arthrose für nicht vollständig geklärt [72].

1.2.2 Pathogenese

Arthrose resultiert aus einem Verlust des Gelenkknorpels, Umbau des subchondralen Knochens und entzündlichen Reaktionen der Synovialis. Als Schlüsselereignis in der Entwicklung der Osteoarthrose ist das Versagen der Chondrozyten in Bezug auf die Kompensation des enzymatisch und mechanisch verursachten Matrixabbaus zu sehen [61].

Die Knorpeldegeneration im Rahmen einer Arthrose ist in zwei Phasen unterteilbar: einerseits in eine biosynthetische Phase, in der Chondrozyten versuchen, die geschädigte extrazelluläre Matrix zu reparieren, und andererseits in eine degenerative Phase, in der es in Folge von enzymatischem Abbau der extrazellulären Matrix und gehemmter Matrixsynthese zu fortschreitender Knorpelzerstörung kommt [88]. In gesundem Knorpel besteht ein Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau, der Matrixumsatz ist genau geregelt. In arthrotischem Knorpel liegt eine Störung in der Regulation vor, es kommt zu einem Ungleichgewicht, wobei sowohl Synthese als auch Abbau gesteigert sind [72].

Nach heutigem Stand sind die genauen Mechanismen der Pathogenese noch nicht vollständig geklärt, einzelne Faktoren, die an der Knorpeldegradation beteiligt sind, sind jedoch bekannt. Der Bereich der Zytokine, die einen Einfluss auf den Stoffwechsel im Gelenkknorpel haben, kann grob in drei Gruppen aufgeteilt werden: destruktive Zytokine, regulierende Zytokine und Wachstumsfaktoren.

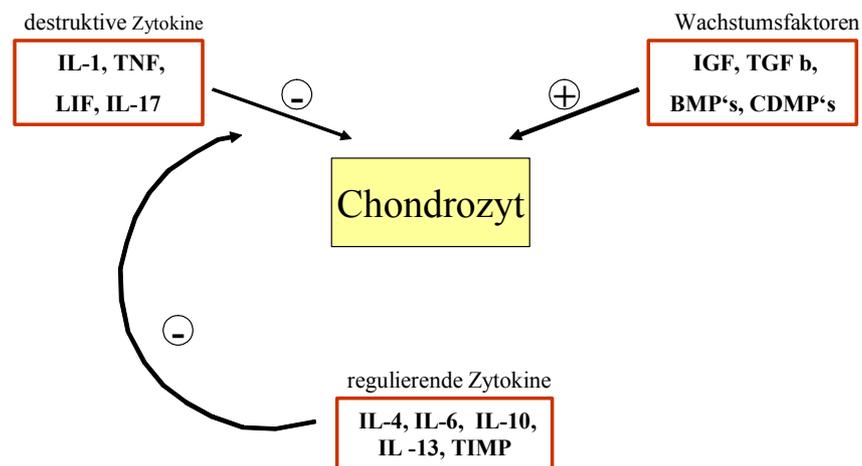


Abbildung 1: schematische Darstellung der Zytokine, die Einfluss auf den Stoffwechsel des Chondrozyten haben

Die Gruppe der destruktiven Zytokine kann am besten anhand von IL-1 (Interleukin) veranschaulicht werden. Dieser Entzündungsmediator hat einerseits einen ausgeprägten suppressiven Effekt auf die Proteoglykansynthese (Kollagen Typ II) und verstärkt andererseits die Synthese von Kollagen Typ I, einem für Fibroblasten typischen Kollagen. IL-1 induziert in den Chondrozyten die Bildung kataboler Proteasen (Metalloproteinasen), die wiederum zum Niedergang des Knorpels führen. Außerdem hemmt es die Proliferation von Chondrozyten, induziert die Produktion von Stickoxid (NO) in den Chondrozyten und eine vermehrte Apoptose der Knorpelzellen. IL-1 wird vorwiegend von Chondrozyten und aktivierten Makrophagen gebildet [84]. Es konnte im Serum und in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Arthritiden unterschiedlicher Genese

nachgewiesen werden. Bei rheumatoider Arthritis korrelieren die Plasmaspiegel von IL-1 β mit dem klinischen Befund [10]. So konnte in einer Studie über IL-1 produzierende Zellen nachgewiesen werden, dass der Anteil der IL-1 produzierenden Makrophagen signifikant höher lag als in gesundem Gewebe [89]. Die erhöhte Expression des Typ I-Rezeptors für IL-1 auf arthrotischen Chondrozyten hat gleichermaßen Einfluss auf die Pathogenese der Osteoarthritis, da die IL-1-Konzentration für eine halbmaximale Stimulation zur Bildung von Metalloproteinasen drei- bis viermal geringer ist als bei normalen Chondrozyten. In arthrotischem Gewebe löst bereits eine Bindung von IL-1 an 1% dieser Rezeptoren eine Produktion von katabolen Enzymen aus, während in gesundem Gewebe 4% der Rezeptoren besetzt sein müssen [88]. Sowohl Chondrozyten als auch Osteoblasten sind in der Lage, neben anderen Zytokinen auch IL-1 α und IL-1 β zu bilden. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass sich subchondrale Knochenveränderungen bereits ereignen können, bevor schwere Veränderungen offensichtlich werden [89]. Neben IL-1 gehören auch TNF (tumor necrose factor), LIF (leukaemia inhibitory factor) und IL-17 zur Gruppe der katabolen Zytokine. Während TNF und LIF wie IL-1 hauptsächlich von Chondrozyten und aktivierten Makrophagen sezerniert werden, stammt IL-17 aus T-Zellen. Das knorpeldestruierende Potential ist jedoch zehnmal geringer als das von IL-1. Seine Produktion und Präsenz im arthrotischen Gelenk werden kontrovers diskutiert [88]. Auch wenn man davon ausgeht, dass IL-1 und TNF von denselben Zellen produziert werden und dieselben Zellen auf gleiche Stimuli die entsprechende Antwort zeigen, ist dies im Falle der Arthritis nicht zutreffend. Hinweise auf eine übereinstimmende Reaktion auf diese beiden Zytokine im weiteren Verlauf der Arthritis fehlen. Im Gegensatz zu Anti-IL-1-Antikörpern oder dem IL-1-Rezeptorantagonisten (IL1ra), die die Knorpelzerstörung bei experimentell verursachter Arthritis stark reduzieren können, wirken Anti-TNF-Antikörper eher antientzündlich. Hingegen erhöht TNF genauso wie IL-1 auch die Synthese von Metalloproteinasen.

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) gehören zu einer Gruppe von Enzymen, die im aktiven Zustand in der Lage sind, alle Bestandteile extrazellulärer Matrix abzubauen. In nahezu allen arthrotischen Knorpelzellen ist eine Erhöhung von vor allem Kollagenasen, Stromelysinen und Gelatinasen nachweisbar. Unter

physiologischen Umständen kontrollieren spezifische Gewebeinhibitoren die MMPs, die so genannten TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) [43]. Es handelt sich dabei um Glykoproteine, die eine hohe Affinität zu den MMPs besitzen, feste Komplexe mit ihnen bilden und so zu deren Inaktivierung führen.

Zur zweiten Gruppe, den regulierenden Zytokinen, gehören Faktoren wie IL-4, IL-10 und IL-13. Diese Zytokine können in gewissem Maß die Produktion von destruierenden Faktoren wie IL-1 und TNF durch Makrophagen und Chondrozyten und die Aktivität der TNF-Rezeptoren hemmen und außerdem die Synthese von deren Inhibitoren wie IL-1ra steigern. IL-4 hat einen direkten positiven Einfluss auf Chondrozyten, indem es die Menge an NO-Synthetase (NOS) reduziert.

NOS wird im Gelenkknorpel produziert und ist maßgeblich an der Synthese des freien Radikals Stickoxid beteiligt. Beide konnten in arthrotischem Gewebe nachgewiesen werden. Stickoxid kann die Proteoglykansynthese und die Antwort der Chondrozyten auf IGF-1 hemmen [80]. Einige Studien weisen auch darauf hin, dass NO ebenfalls eine Rolle bei der Apoptose von Chondrozyten und Synovialzellen spielt [2, 25].

IL-6 ist ein weiteres Zytokin, das zur protektiven Gruppe gezählt werden kann. Es wirkt chemotaktisch auf Makrophagen, induziert die Proliferation der Chondrozyten und verstärkt einerseits die Effekte von IL-1 auf die Synthese von MMPs und andererseits die Inhibition der Proteoglykansynthese. IL-6 kann hier die Produktion von TIMP induzieren, jedoch nicht die der Metalloproteinasen selbst, was darauf schließen lässt, dass IL-6 am Feedback-Mechanismus beteiligt ist und somit der Knorpelzerstörung entgegenwirkt [39]. Dass IL-6 fähig ist, die TNF-Rezeptor-Expression bei Leberzellen zu fördern, gilt als gesichert [83]. Somit liegt die Vermutung nahe, dass dieses Zytokin ebenfalls für die Expression von TNF-Rezeptoren bei Chondrozyten verantwortlich sein könnte. In einer in-vivo-Studie an IL-6-defizienten Mäusen mit experimentell verursachter Arthritis zeigte sich eine verminderte Entzündung im Gelenk, während die Knorpelzerstörung signifikant erhöht war [15].

Die letzte Gruppe bilden die Wachstumsfaktoren. Unter physiologischen Bedingungen ist IGF-1 (insuline like growth factor-1) im erwachsenen Gelenkknorpel der wichtigste anabole Faktor dieser Gruppe. Wachstumsfaktoren

unterbinden nicht direkt die Produktion oder Funktion von IL-1, können aber dem katabolen Effekt von IL-1 entgegenwirken. Sie alle wirken zellvermehrend auf Chondrozyten und stimulieren im Gelenkknorpel die Synthese der Knorpelmatrix [44, 45, 57, 67].

Gerade im Zusammenhang mit IL-1 und TNF ist IGF-1 in der Lage, den Abbau von Proteoglykanen zu reduzieren und die Proteoglykansynthese in Chondrozyten zu steigern. Bei Arthrose ist die Konzentration von IGF-1 im Serum vermindert, während das Niveau intrazellulär in arthrotischem Gewebe erhöht ist [9]. Neben IGF-1 gibt es noch eine Reihe anderer Wachstumsfaktoren, die Einfluss auf die Syntheseaktivität der Chondrozyten haben, nämlich TGF- β (transforming growth factor- β), BMPs (bone morphogenic proteins) und CDMPs (chondrocyte derived morphogenic proteins). TGF- β stimuliert Chondrozyten in gesundem Gewebe nur schwach, aber bei längerer Exposition mit TGF- β kommt es zu einer Veränderung des Phänotyps und die Chondrozyten werden für TGF- β sensibler. Somit führt eine erneute Stimulation dann zu einer deutlichen Steigerung der Synthesefähigkeit von Proteoglykanen [88]. TGF- β wirkt chemotaktisch, Leukozyten werden in die Synovia gelockt. Zudem ist in der Synovia eine deutliche Proliferation von Fibroblasten feststellbar, wobei jedoch im Zusammenhang mit TGF- β der Proteoglykanabbau im Gelenkknorpel deutlich vermindert ist [22].

Des Weiteren gibt es noch eine vierte Gruppe, die auf der Zelloberfläche zu finden ist, die so genannten MT-MMPs (membrane type-MMPs). Sie aktivieren die anderen drei Gruppen beziehungsweise unterstützen deren Aktivität.

Zusammengefasst scheint die Pathogenese der Arthrose das Resultat einer übermäßigen Produktion von katabolen Faktoren zu sein. Jedoch führen auch eine nicht ausreichende Stimulation mittels anabolen Faktoren wie eine inadäquate Kontrolle durch die regulierenden Zytokine zu dem gleichen Ergebnis. Das Gleichgewicht der einzelnen Mediatoren ist möglicherweise ein wesentlich entscheidenderer Faktor in der Entstehung von Knorpelzerstörung, verglichen mit der Konzentration einer einzelnen destruktiven Substanz wie IL-1.

1.2.3 Epidemiologie und sozialökonomische Bedeutung

Die degenerativen Gelenkerkrankungen sind von großer sozialmedizinischer Bedeutung. Aufgrund ihrer Häufigkeit nehmen die Arthrosen und ihre Behandlung eine zentrale Stellung ein. In den Statistiken der Krankenkassen besitzen sie hinsichtlich Behandlungskosten, Rehabilitationsmaßnahmen, Arbeitsausfall und Invalidität bzw. frühzeitige Berentung einen hohen Stellenwert [69]. Das veränderte Freizeitverhalten sowie die Bevölkerungsstruktur in den Zivilisationsländern tragen gleichermaßen zu einem derart häufigen Auftreten der Arthroseerkrankungen im Verhältnis zur Gesamtbevölkerung bei. Aufgrund der steigenden Überalterung der Gesellschaft werden in den kommenden Jahren diese Erkrankungen, die mit dem Alter überproportional zunehmen, im Budget des Gesundheitswesens weiter an Bedeutung gewinnen. Bereits jetzt sind die verursachten Kosten immens: circa 5 Milliarden Euro wurden im Jahr 2004 allein im Zusammenhang mit der Behandlung, Arbeitsunfähigkeit sowie vorzeitiger Verrentung aufgrund rheumatoider Arthritis aufgebracht [14].

1.2.4 Therapie

Problematisch in der Behandlung ist die Tatsache, dass Arthrose zu Beginn zunächst schmerzlos und asymptomatisch verläuft und zu dem Zeitpunkt, wenn sich der Patient zur Behandlung vorstellt, bereits ein beachtlicher Knorpelschaden vorliegt.

Die Behandlungsmöglichkeiten der Arthrose können grob in zwei Gruppen aufgeteilt werden, konservativ und chirurgisch-orthopädisch.

Die konservative Therapie bedient sich oftmals verschiedener medikamentöser Möglichkeiten. Hier sind vor allem nicht-steroidale Antiphlogistika wie Diclofenac (Voltaren®) oder COX-2 prädisponente Antiphlogistika wie Rofecoxib (Bextra®) zu nennen. Manchmal werden intraartikuläre Injektionen vorgenommen, man stützt sich auf Hyaluronsäure-Präparate (HYALART®, Synvisc®), Steroidinjektionen und Homöopathika (Zeel® P). Des Weiteren ist die orale Gabe von Glukosaminsulfat

(Dona® 200-S, Progona®) eine Möglichkeit der medikamentösen Schmerzlinderung und Funktionsverbesserung. In Ergänzung zu den medikamentös-konservativen Behandlungsstrategien gibt es noch mechanische Möglichkeiten wie Fersenpuffer, Schuhranderrhöhungen, Knieschienen und Gewichtsabnahme. Allen angeführten konservativen Alternativen ist gemeinsam, dass sie lediglich zur Schmerzlinderung führen. Es handelt sich also um eine rein symptomatische Behandlung, eine tatsächliche positive Beeinflussung des progressiven Verlaufs der Arthrose konnte noch nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Daneben besteht noch die Möglichkeit, Arthrose chirurgisch zu behandeln. Hier kann im Rahmen einer Gelenkspiegelung eine Gelenkspülung vorgenommen werden mit dem Ziel, für einen gewissen Zeitraum Schmerzfreiheit im betroffenen Gelenk zu erreichen. Wenn nur ein eingegrenzter Bereich zum Beispiel des Kniegelenks betroffen ist, kann durch eine Umstellungsosteotomie eine Verteilung der Last auf weniger stark geschädigte Teile erreicht werden. Aufgrund der oftmals nicht aufzuhaltenden Verschlechterung der Symptome mit zunehmendem Alter stellt vielfach der Ersatz der zerstörten Gelenkflächen mittels künstlicher Endoprothese ein unumgängliches Behandlungsverfahren dar. Dies betrifft vor allem Knie- und Hüftgelenke. Da ein Gelenkersatz jedoch nur eine begrenzte Haltbarkeit aufweist, wird diese Behandlungsstrategie erst nach dem 60. Lebensjahr angestrebt. Die Versorgung mit Hilfe einer Endoprothese ist somit limitiert, die Behandlung gerade jüngerer Patienten bleibt problematisch; in vielen Fällen sind die Betroffenen letztlich auf einen Rollstuhl angewiesen.

1.3 VEGF

Bei VEGF (vascular derived endothelial growth factor) handelt es sich um ein homodimerisches, glykosyliertes Protein von 46-48 kDa Molekulargewicht. Die beiden Untereinheiten von ca. 24 kDa sind mittels Disulfid-Brücken verbunden. Das VEGF-System umfasst fünf verschiedene VEGF-Isoformen mit unterschiedlichem Bindungsverhalten an drei zugehörigen Tyrosinkinaserzeptoren [76]. Beim Menschen kommt VEGF in den Isoformen mit 121, 165, 189 und 206 Aminosäuren vor, die alle durch alternatives „Splicing“ aus derselben mRNA hervorgehen [16]. Die Gensequenz hat eine Länge von 12 kb und umfasst 8 Exone. Geht man von der 189 Aminosäuren langen VEGF-Form aus, entsteht VEGF 165 durch Fehlen des Exon 6a und VEGF 121 durch Fehlen der Exone 6 und 7 [30]. (siehe Abbildung 2)

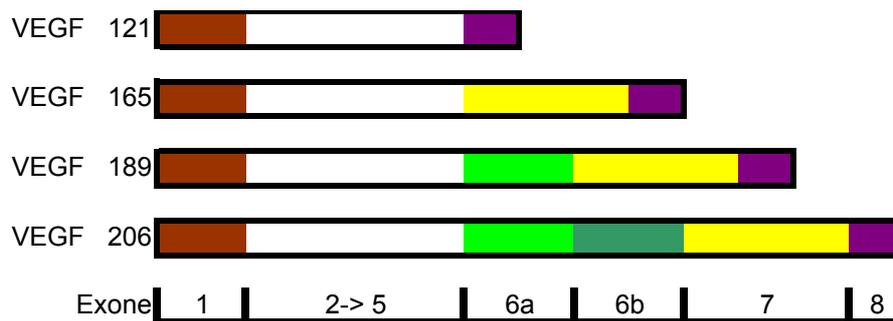


Abbildung 2: Die verschiedenen VEGF-Isoformen entstehen durch alternatives Splicing derselben mRNA (Abbildung nach C. Robinson, The splice variants of VEGF and their receptors (2001))

Die einzelnen Isoformen unterscheiden sich somit auch in ihren Molekulargewichten und biologischen Eigenschaften wie Bindungsvermögen an Heparin, Heparansulfat-Proteoglykane oder an die verschiedenen VEGF-Rezeptoren. Die Transkripte VEGF 121, VEGF 145 und VEGF 165 werden in den Extrazellulärraum sezerniert, während VEGF 189 fest an Heparansulfat der Zelloberfläche gebunden bleibt und es sich bei VEGF 206 um ein integriertes Membranprotein handelt [11]. Im Gegensatz zu den anderen Isoformen bindet VEGF 121 nicht an Heparin oder extrazelluläre Matrix-Proteoglykane.

VEGFR-1 - oder auch der Tyrosinkinase-Rezeptor FLT-1 (fms-like tyrosine kinase-1) - bindet VEGF 121 und VEGF 165. VEGFR-2 - oder auch die KDR (kinase domain region / flk-1, fetal liver kinase-1) - bindet zusätzlich zu diesen beiden auch noch die beim Menschen nicht sezernierte Form VEGF 145 und die VEGF-verwandten Peptide. Dagegen binden die Co-Rezeptoren Neuropilin -1 und -2 exklusiv VEGF 165, die Isoform, die in der Mehrzahl aller verschiedenen Gewebe am häufigsten vorkommt [16].

Ursprünglich ging man davon aus, dass die beiden Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 überwiegend in Endothelzellen vorhanden sind, aber neuere Studien zeigen, dass andere Zellarten ebenfalls einen der beiden Rezeptoren produzieren: VEGFR-1 von Trophoblasten (Plazenta), Monozyten und Mesangiumzellen (Nierenglomeruli), VEGFR-2 von blutbildenden Stammzellen, Megakaryozyten [33] und Chondrozyten bei Osteoarthritis. Der dritte Tyrosinkinase-Rezeptor VEGFR-3 (oder auch FLT-4, fms-like tyrosine kinase-4) wird vornehmlich in Endothelzellen des Lymphsystems exprimiert [34, 40]. Shakibaei et al. konnten ihn jedoch ebenfalls in Chondrozyten bei Osteoarthritis nachweisen [76]. Der vollständige Regulationsmechanismus der Rezeptoren ist noch nicht geklärt. In Bezug auf osteoarthritischen Knorpel wird vermutet, dass aufgrund der verminderten Sauerstoffkonzentration, durch die in verschiedenen Geweben endothelialen Ursprungs VEGFR-1 und VEGFR-2 hervorgerufen werden, ebenfalls die Expression der Rezeptoren angeregt wird [13].

Somit ist das Vorkommen der einzelnen Isoformen gewebeabhängig. In manchen Geweben sind die unterschiedlichsten VEGF-Transkripte nachweisbar; so finden sich in menschlichen Neonatalfibroblasten alle vier Isoformen, während andere Zelltypen lediglich einige spezielle Splice-Formen hervorbringen so zum Beispiel Zellen der rheumatoiden Synovialmembran oder Zellen des osteoarthritischen Knorpels [64, 65]. In Chondrozyten der Wachstumszonen konnte die Expression der Isoformen VEGF 121 und VEGF 165 nachgewiesen werden [60].

VEGF ist ein wichtiger Botenstoff der Angiogenese sowohl während der Embryonalentwicklung, der Gewebeneubildung und Wundheilung als auch bei malignem sowie entzündlichem Geschehen, beispielsweise via Plasmaeinblutung [18, 27]. Zudem wird er unter den verschiedenen pathologischen Bedingungen wie

beispielsweise im ischämischen Myokard, bei diabetischer Retinopathie und Osteoarthritis produziert [13].

Ursprünglich wurde VEGF über den physiologischen Zusammenhang hinaus vor allem im Zusammenhang mit tumorösen Geweben gefunden, aber neuere Studien haben gezeigt, dass die Expression von VEGF vielen verschiedenen Zelltypen zugeschrieben werden kann, so beispielsweise glatten Gefäßmuskelzellen, Monozyten, Mesangiumzellen (Nierenglomeruli) und Megakaryozyten [48].

Neben der Induktion von endothelialer Zellproliferation und -migration ist VEGF ein Prokoagulant und wirkt als chemotaktischer Faktor für Monozyten. VEGF ist in das Fortschreiten der Synovial-Läsion nicht nur durch die Induktion der Angiogenese involviert, sondern auch mittels Steigerung der Entzündung durch Anlockung von Monozyten in die Synovialmembran. Außerdem ist VEGF fähig, eine Expression von Plasminogenaktivatoren (sowohl Urokinase als auch Geweb plasminogenaktivator t-PA) sowie auch eine Verstärkung der Aktivität von Antithrombin III zu induzieren. Dies wirkt zugunsten einer proteolytischen Aktivität, die aus der Entstehung von Plasmin aus Plasminogen resultiert [31]. Plasmin wiederum aktiviert Matrixmetalloproteinasen, welche bei der Zerstörung von arthritischem Gelenkknorpel eine wichtige Rolle spielen.

In der physiologischen Knochenentwicklung wurde VEGF als notwendiger Faktor für die endochondrale Ossifikation identifiziert, wobei Knorpel in Knochen umgebaut wird. Das Einwachsen von Blutgefäßen in den Knorpel, der normalerweise avaskulär ist, ist wohl der entscheidende Schritt in diesem Prozess. Die Gefäßanordnung stellt eine Grundlage für die Rekrutierung der in Knorpelresorption und Knochenablagerung involvierten Zelltypen dar [20]. Petersen et al. [60] untersuchten die Expression der verschiedenen VEGF-Spliceformen und -Rezeptoren im Gewebe von Feten, Neugeborenen und Kindern. Sie fanden in allen Proben als einzige Splice-Formen VEGF 121 und VEGF 165, außerdem konnten die Autoren das Vorkommen von VEGFR-1 und VEGFR-2 nachweisen.

Während der normalen Knochengeneses werden die Chondrozyten in der Epiphysenfuge hypertrophisch, produzieren angiogene Faktoren und gehen schließlich mittels Apoptose zugrunde. Hier wird vermutet, dass VEGF zur Apoptose der Chondrozyten in der Wachstumsfuge beiträgt, indem es die

Freisetzung eines pro-apoptotischen Faktors aus Blutgefäßen veranlasst [61]. VEGF ist wohl der wichtigste Faktor der Blutgefäßentwicklung und wird nur in der hypertrophischen Phase der Chondrozyten produziert, jedoch nicht während der Ruhe- und Wachstumsphase [60]. Des Weiteren verbindet VEGF die Angiogenese mit hypertrophem Knorpelabbau und der Verknöcherung während der endochondralen Knochenentwicklung. Im Einzelnen verzögert sich nach Hemmung der VEGF-Aktivität durch Bindung des Proteins an einen löslichen Rezeptor der Zelltod der hypertrophen Chondrozyten. Die Anlockung der Chondroklasten, von Monozyten abgeleitete Zellen, ist herabgesetzt [63].

Die Schlüsselrolle von VEGF in der embryonalen und juvenilen Knochenbildung aus Knorpel steht im Gegensatz zu dessen geringem Vorkommen im Knorpelgewebe bei Erwachsenen.

1.4 VEGF und Arthrose

Die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen VEGF und der Bildung neuer Blutgefäße in osteoarthritischem Knorpel besteht, wurde schon früh untersucht. Wie wichtig die Rolle des Wachstumsfaktors in derartig verändertem Gewebe ist, wurde durch weitere Untersuchungen im Laufe der Zeit immer deutlicher. So beobachteten bereits Radin et al. 1971 das Auftreten von VEGF im Tiermodell an Rindern als Reaktion auf wiederholte Belastungsreize [66]. 1983 konnte dieses Erkenntnis von Bullough et al. [5] auch in menschlichem Gewebe nachgewiesen werden.

Pufe et al. [63, 64, 65] verfolgten diesen Gedanken weiter und untersuchten im Rahmen verschiedener Studien, welche Splice-Formen von VEGF in arthrotisch geschädigten humanen Geweben identifiziert werden können. Grundsätzlich konnten die Autoren VEGF in gesundem, erwachsenem Knorpelgewebe nicht finden. In Gewebeproben von Patienten, die an Osteoarthrose erkrankt waren, wiesen sie jedoch die Splice-Formen VEGF 121 und VEGF 189 deutlich nach. Bei der Untersuchung in Bezug auf die VEGF-Rezeptoren konnte nur das Vorkommen von VEGFR-2 dokumentiert werden. Neben den Endothelzellen, die beide

Rezeptoren, VEGFR-1 und VEGFR-2, exprimieren, können somit Chondrozyten ebenso mittels lokal produziertem VEGF stimuliert werden [63]. In von Pfander et al. [61] untersuchten Gewebeproben aus menschlichen Kniegelenken an Arthrose erkrankter Spender wurde mittels RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) und immunhistochemischer Untersuchungen bewiesen, dass VEGF 165 sowohl in normalem wie osteoarthritisch verändertem Knorpelgewebe nachgewiesen werden kann. Dabei kommt es gerade in den späten Stadien der Osteoarthrose zu einer signifikanten Erhöhung der VEGF positiven Chondrozyten. Diese Erkenntnisse untermauerten Enomoto et al. [13] 2003 mit ihrer Studie. Darin beschreiben sie nach Untersuchung von gesundem und osteoarthritisch geschädigtem, menschlichem Gewebe die Expression von VEGF 121, VEGF 165 und VEGF 189 in entsprechender Häufigkeitsverteilung. Sie wiesen jedoch lediglich in den pathologisch veränderten Gewebeproben VEGFR-1 und VEGFR-2 nach. Damit vergleichbare Ergebnisse erzielten Shakabei et al. [76]. Sie fanden bei ihrer Studie am Gelenkknorpel des menschlichen Kniegelenks ein wesentlich höheres Vorkommen von VEGFR-3 bei Osteoarthrose als in gesundem Knorpelgewebe. Übertragen auf das Krankheitsbild der rheumatoiden Arthritis wurden in Proben derartig geschädigten Gewebes die Splice-Formen VEGF 121 und VEGF 165 dokumentiert [65]. Im Vergleich der Serumkonzentration von VEGF bei rheumatoider Arthritis und bei Osteoarthrose ist diese im Fall der rheumatoiden Arthritis signifikant höher ($p < 0,05$) [23].

Es ist die Frage, ob die Vaskularisation ein Reparaturversuch ist oder ob sie stattdessen dazu beiträgt, den eigentlichen Schaden durch Schädigung der biomechanisch wichtigen Festigkeit des Knorpels zu potenzieren.

Nakahara et al. [53] untersuchten, welche Rolle VEGF im Rahmen der Interleukin-6- Rezeptor-Antagonisten-Therapie bei rheumatoider Arthritis spielt. Sie konnten darstellen, dass eine Therapie mit systemisch eingesetzten monoklonalen Antikörpern die Anzeichen und Symptome der Arthritis vermindert und eine Verbesserung um 20 % bewirkt. Sie zeigten, dass IL-6 zusammen mit IL-1 die Produktion von VEGF in Kulturen menschlicher Synovialfibroblasten vermehrt und kommen zu dem Ergebnis, dass durch Hemmung der IL-6 –Aktivität das bei Arthritis typischerweise erhöhte Serumniveau von VEGF gesenkt werden kann.

Die Erkenntnisse aus den verschiedenen Studien bieten bereits erste Ansatzpunkte für medikamentöse Therapiekonzepte der Osteoarthrose. Nagashima et al. [52] untersuchten die Wirkung von verschiedenen antirheumatischen Medikamenten (disease-modifying anti-rheumatic drugs) auf die Produktion von VEGF im Gewebe von Patienten mit rheumatoider Arthritis und Osteoarthrose. Hier wurden neben anderen Substanzen auch der Penicillaminabkömmling Bucillamin und das Kortikoid Dexamethason untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl Bucillamin als auch Dexamethason eine Hemmung der VEGF-Produktion bewirken. Von den untersuchten Substanzen zeigte Bucillamin die höchste Wirkung. In beiden Fällen ist die Wirkung vor allem dosisabhängig, beide hemmen die Erstellung der VEGF-mRNA. Dexamethason wirkt dabei im Transkriptionsprozess am Promotor des VEGF-Gens [54].

Gene, die während der Entwicklung exprimiert werden, sind oftmals im Krankheitsfall wieder nachweisbar. Genau wie andere Substanzen, die die Gefäßneubildung fördern, tritt VEGF bei verminderter Sauerstoffkonzentration vermehrt auf. Dies trifft insbesondere auf die Osteoarthrose zu. Aus diesem Grund wurde das Vorkommen von VEGF in Knorpelgeweben nach experimenteller Arthrose mit histologischen und immunhistochemischen Methoden untersucht.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Obwohl sich ständig neue Parameter finden, ist die Erforschung der Arthroseentstehung noch lange nicht abgeschlossen. Bisher gibt es zwar Bestrebungen, anhand dieser gefundenen Bausteine die medikamentöse Arthrosetherapie zu optimieren, jedoch ist trotz all dieser Ansatzpunkte derzeit keine kausale Lösung in Sicht. In vorangegangenen Studien konnte das Vorkommen von VEGF in osteoarthrotischem Gelenkknorpel nachgewiesen werden. Um jedoch eine Einflussmöglichkeit auf den Verlauf der Gelenkschädigung zu gewinnen, ist eine Untersuchung dieses Parameters in den Frühstadien der Arthroseentstehung sinnvoll. Da sich eine Probengewinnung von menschlichen Geweben zu diesem

Zeitpunkt aus praktischen wie ethischen Gründen verbietet, sind tierexperimentelle Untersuchungen nicht zu umgehen. Dabei sollte die Ätiologie im Tiermodell durch geeignete Wahl der Methode zur Induktion der Arthrose dem menschlichen Verlauf möglichst ähnlich sein.

Die vorliegende Studie soll die Expression von VEGF im zeitlichen Verlauf bei einer experimentell durch Destabilisation induzierten, sekundären posttraumatischen Arthrose am Kaninchenkniegelenk untersuchen. Hierbei soll insbesondere auf die Analyse eines möglichen Zusammenhangs zwischen den makroskopischen sowie mikroskopischen Veränderungen des Gelenkknorpels und der VEGF-Expression Wert gelegt werden.

2 Material und Methode

2.1 Versuchsaufbau

Der Versuch wurde mit 28 weiblichen, gleichaltrigen, ausgewachsenen, weißen Neuseelandkaninchen durchgeführt. Die Tiere wurden in drei Versuchsgruppen aufgeteilt.

Gruppe 1 (12 Tiere) erhielt beidseitig eine Eröffnung des Kniegelenks ohne weitere Eingriffe in Binnenstrukturen mit anschließendem Wundverschluss. Sie diente als Kontrollgruppe.

Gruppe 2 (12 Tiere) wurde nach Eröffnung des Kniegelenks beidseitig das vordere Kreuzband reseziert und anschließend das Gelenk verschlossen.

Allen Tieren der Gruppen 1 und 2 wurde zum Zeitpunkt der Operation aus beiden Kniegelenken eine Probe der Synovialflüssigkeit entnommen. Nach der Operation durften sich die Kaninchen frei im Käfig bewegen.

Gruppe 3 erhielt keine Operation. Zur Gewinnung von Referenzwerten wurden zu Versuchsbeginn bereits diese 4 nicht operierten Tiere getötet.

Aus jeder Versuchsgruppe wurden dann jeweils 4 Kaninchen nach 3, 6 und 12 Wochen getötet. Eine zweite Probe der Synovialflüssigkeit wurde zum Zeitpunkt der Tötung gewonnen.

Der gesamte Tierversuch sowie die Haltung der Tiere wurden unter der Tierversuchsnummer G 49/2000 von der Bezirksregierung Münster und vom Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt Münster genehmigt.

2.2 Tiermodell

Experimentell induzierte Arthrose ist seit langem ein erprobtes Modell zur Erforschung der Arthroseentstehung. Beim Menschen ergibt sich regelmäßig die Schwierigkeit, dass sich gerade die Anfangsstadien der Untersuchungsmöglichkeit entziehen, da die Patienten zu diesem Zeitpunkt noch symptomfrei sind. In der Literatur finden sich vergleichbare Versuchsanordnungen mit unterschiedlichen Tierarten, so zum Beispiel: weißes Neuseelandkaninchen, Hund und Schaf. Im Rahmen dieser Untersuchung fiel die Wahl auf das Neuseelandkaninchen als Versuchstier. Es hat sich für diese Art Studiendesign bereits bewährt [42]. Man unterscheidet im Tierexperiment grundsätzlich zwei Möglichkeiten der Arthroseinduktion, zum einen die Induktion durch chemische Manipulation und zum anderen durch mechanische Manipulation. Eine chemische Induktion kann durch Injektion von Papain, Zymokin, Monoiodoacetat oder Interleukin 1 Beta in das Gelenk ausgelöst werden [26, 29, 35]. Jedoch haben alle diese Modelle den Nachteil, dass sie einen im initialen Ausmaß unbekanntem Knorpelschaden hervorrufen und zudem die entstehende Arthrose mit keiner der beim Menschen auftretenden Formen vergleichbar ist.

Zur mechanischen Induktion findet man in der Literatur vielfältige, erprobte Verfahren. Die Bandbreite reicht von der Immobilisation [58] oder Denervierung des Gelenks [56] über die direkte mechanische Zerstörung des Knorpels mittels eines Skalpell bis hin zur Destabilisierung des Gelenks [81]. Das letztgenannte Modell kommt der Pathogenese der Gonarthrose beim Menschen am nächsten, auch wenn hiermit nur ein kleiner Anteil der posttraumatischen sekundären Arthrosen nachgeahmt werden kann.

2.3 Operationsmethode

Alle Kaninchen wurden durch eine intramuskuläre Injektion mit Ketamin (10%, Sanofi-CEVA) und Xylazin (2%, CEVA) anästhesiert. Die Dosierung der Anästhetika variierte individuell stark, sie wurde nach klinischer Beurteilung von Reflexen und Pupillenweite gewählt. Anschließend wurden beide Kniegelenke grob rasiert und mit medizinischer Enthaarungscreme (Pilca) vollständig enthaart. Nachdem das Tier in Rückenlage gelagert war, wurde das Operationsfeld mit Neokodan mehrmals desinfiziert und steril abgedeckt. Anschließend wurden beide Kniegelenke zur Injektion von jeweils 2 ml 0,9% Kochsalzlösung von mediokaudal punktiert. Um die Spülflüssigkeit zu verteilen, wurde jedes Kniegelenk zwanzigmal bewegt und anschließend über dieselbe Punktionsstelle die maximal mögliche Menge an Flüssigkeit aspiriert. Nach einer medialen, parapatellaren Inzision der Haut (ca. 3 cm) wurde das Kniegelenk eröffnet, die Patella nach lateral luxiert und das vordere Kreuzband dargestellt. Bei Tieren der Kontrollgruppe (Gruppe 1) wurde das Kniegelenk anschließend lediglich mit 2 ml 0.9 % Kochsalzlösung gespült und ohne weitere Eingriffe an Binnenstrukturen sofort verschlossen. Den Kaninchen der Gruppe 2 wurde nach Darstellung der Kreuzbänder das vordere Kreuzband unter Verwendung eines spitzen Skalpells reseziert und das Gelenk mit 2 ml 0,9 % Kochsalzlösung gespült. Zur Überprüfung der Durchtrennung des Kreuzbandes wurde intraoperativ ein Lachmann-Test durchgeführt.

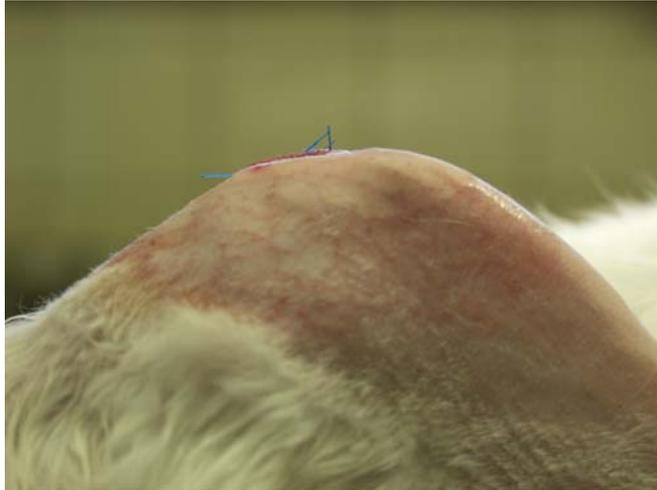


Abbildung 3: intraoperativer Lachmantest, Knie in Normalstellung



Abbildung 4: intraoperativer Lachmantest, deutlich nachweisbare vordere Schublade

Der Wundverschluss erfolgte in zwei Schichten: Nach Verschluss der Gelenkkapsel mit Einzelknopfnähten (2-0 vicryl) wurde die Haut ebenfalls mit Einzelknopfnähten (3-0 Prolene, Ethicon, Johnson & Johnson InH.) adaptiert.

Postoperativ wurden jedem Kaninchen subkutan zur initialen Schmerzbekämpfung 0,8 ml Novalgin (Hoechst Marion Roussel) und zur antibiotischen Prophylaxe 0,8 ml eines Breitbandantibiotikums (Tardomyocel) injiziert. Im Anschluss konnten sich die Kaninchen in ihren Käfigen (100 x 70 x 40 cm) frei bewegen. Im Hinblick auf Infektionen und andere Komplikationen wurden sie engmaschig untersucht.



Abbildung 5: Wundversorgung postoperativ



Abbildung 6: Kaninchen nach Operation beider Kniegelenke

2.4 Probenentnahme und Aufbereitung der Proben

Die Kaninchen wurden mit Ketamin (10%, Sanofi-CEVA) und Xylazin (2%, CEVA) anästhesiert und dann mittels Durchtrennung der großen Halsgefäße getötet. Durch Punktion wurde anschließend aus jedem Knie eine Probe Synovialflüssigkeit gewonnen. Zur Entnahme von Femur, Tibia und Patella wurden beide Kniegelenke mittels Querinzision der Patellasehne eröffnet und die gewonnenen Proben bei -80 °C tiefgefroren.

2.4.1 Makroskopische Beurteilung

Vor der Weiterverarbeitung der Proben wurden die entnommenen Gelenke zunächst von zwei unabhängigen Untersuchern nach 4 Kriterien makroskopisch beurteilt:

Bewertet wurden das Auftreten von Fibrillationen und Ulzerationen des Knorpels, das Ausmaß osteophytärer Anbauten und Vorkommen eines Ergusses. Je nach Schweregrad wurde den makroskopischen Befunden ein Punktwert zugeordnet und die einzelnen Werte zu einem Gesamtpunktwert addiert. Somit ergaben sich Gesamtpunktwerte zwischen 0 und 11, wobei ein Gesamtpunktwert „0“ einer makroskopisch gesunden Gelenkfläche und ein Gesamtpunktwert „11“ einer makroskopisch hochgradigen Arthrose entspricht (siehe Tabelle 1).

I	Fibrillationen	Grad
	Keine	0
	gering	1
	mittelgradig	2
	ausgeprägt	3
II	Ulzerationen	Grad
	keine	0
	kleinflächig	1
	großflächig	2

III	Osteophyten	Grad
	keine	0
	gering	1
	mittelgradig	2
	ausgeprägt	3
IV	Erguss	Grad
	kein	0
	gering	1
	mittelgradig	2
	ausgeprägt	3

Tabelle 1: Makroskopische Beurteilung

2.4.2 Gewinnung der histologischen Schnitte

Nach Auftauen der Gelenkanteile in Formalinlösung (4% gepuffertes Formalin) wurde jeweils der mediale Femurkondylus mittels einer Laubsäge entnommen und für 10 Wochen in 20% EDTA (pH 7,4) bei 37°C im Wärmeschrank entkalkt. Nach der Entkalkung wurden die Proben über Nacht unter fließendem Leitungswasser gespült, jeweils 6 Stunden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 75%, 90%) und zweimal über Nacht in 100% Isopropylalkohol bei 45°C entwässert. Anschließend wurden die Proben für 12 Stunden jeweils bei 60°C in eine Isopropylalkohol- und Paraffinmischung (50:50) überführt und dann für dreimal 12 Stunden in Paraffin gelegt. Mit Hilfe der Einbettstation AP 280 der Firma Microm erfolgte die Einbettung der Proben in Paraffin. Die Blöcke härteten bei Raumtemperatur aus und wurden zum Schneiden bei 6°C im Kühltank gekühlt und dort auch aufbewahrt. Mit dem Schlittenmikrotom (Firma Jung) wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Für die

Übersichtsfärbungen wurden die Schnitte mittels Eiweißglyzerin (10 Tropfen auf 100 ml destilliertes Wasser) auf Objektträgern der Firma Engelbrecht aufgebracht, für die immunhistochemischen Färbungen mittels destilliertem Wasser auf Superfrost Plus Objektträgern (Firma Menzel). Anschließend wurden alle Schnitte bei 42°C auf dem Strecktisch und im Wärmeschrank gestreckt. Die vollständige Entkalkung wurde mittels einer Alizarin-rot-S-Färbung überprüft.

2.4.3 Färbeverfahren

2.4.3.1 Hämatoxillin-Eosin-Färbung (HE)

Die Schnittpräparate wurden zweimal für jeweils 5 Minuten in Xylol und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70% Ethanol) und destilliertem Wasser entparaffiniert. Zum Färben wurden die Schnitte dann für 5 Minuten in eine Hämalaulösung nach Mayer gelegt und anschließend für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Des Weiteren wurden die Schnittpräparate für 2 Minuten in Eosin gefärbt. Bevor die Proben wieder in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 5 Minuten in 96% Ethanol, 100% Ethanol und zweimal je 5 Minuten in Xylol) hochgeführt wurden, erfolgte eine kurze Spülung mit 70% Ethanol. Die fertigen Präparate wurden mit Eukitt eingedeckt.

Diese Färbung zeigt Zellkerne, Kalk und Knorpelsubstanz blau, während Bindegewebe, Kollagenfasern, Erythrozyten und Zytoplasma in Rottönen dargestellt werden.

2.4.3.2 Safranin-O-Färbung

Die Schnitte wurden zweimal für 5 Minuten in Xylol und dann jeweils in absteigender Reihe für jeweils 5 Minuten in 100%, 96%, 70% Ethanol und destilliertem Wasser entparaffiniert. Anschließend wurden die Proben für 4 Minuten in Weigerts Eisenhämatoxin (Merck, Lösung A und B in Mischung 1:1) und dann kurz in angesäuertem Alkohol (1 ml konzentrierte Salzsäure in 100 ml 70% Ethanol) gegeben. Es folgte zunächst eine Wässerung für 3 Minuten unter fließendem Leitungswasser und dann eine dreiminütige Färbung mit Echtgrün 0,02%, 30 Sekunden Spülung mit 1% Essigsäure und eine Färbung mit Safranin-O für 5 Minuten. Anschließend wurden die Proben wieder mittels aufsteigender Alkoholreihe (je 5 Minuten 70%, 96%, zweimal 100% Ethanol und zweimal 5 Minuten Xylol) hochgeführt und die fertigen Präparate mit Eukitt eingedeckt. Diese Färbung stellt Proteoglykane rot, das Zytoplasma grün und die Zellkerne schwarz dar.

2.4.3.3 Immunhistochemische Färbung VEGF

Die Schnitte wurden zweimal für 5 Minuten in Xylol und dann jeweils in absteigender Reihe für jeweils 5 Minuten zweimal in 100 %, dann in 96 %, 70 % Ethanol und destilliertem Wasser entparaffiniert und mit Tris-Spülpuffer (0,05 M, pH-Wert 7,4-7,6) abgespült. Alle nachfolgenden Schritte wurden dann in einer feuchten Kammer durchgeführt. Nachdem alle Proben mittels eines Fettstiftes (DAKO Pen S 2002) umrandet waren, wurden sie für 5 Minuten mit 3% Wasserstoffperoxyd in Tris-Puffer behandelt, um die bereits im Gewebe vorhandene endogene Peroxidase irreversibel zu hemmen. Dann wurden die Objektträger dreimal für jeweils 2 Minuten in Tris-Puffer gespült.

Überfixierung des Gewebes in Formalin kann die Bildung übermäßiger Aldehydvernetzungen zur Folge haben, die die Gewebsantigene maskieren und deren Nachweis mit dem Primärantikörper verhindern. Um die Antigenstellen zu demaskieren, wurden die Proben anschließend für 5 Minuten mit Proteinase K

(DAKO S3020) zur Vorbereitung auf das immunhistochemische Färbeverfahren bedeckt. Um dann die Reaktion der Proteinase zu stoppen, wurden die Objektträger zwei Minuten in kaltes destilliertes Wasser gestellt.

Dann wurden die Proben dreimal für je 2 Minuten in Tris gegeben und anschließend für 10 Minuten mit Kälberserum (1% BSA in Tris-Puffer) vollständig inkubiert. Nachdem das Kälberserum sorgfältig abgekippt war, wurde als Primärantikörper eine monoklonale Lösung mouse-IgG (DAKO Cat# GF41 verdünnt mit TRIS/BSA, in einer Verdünnung 1:50) verwandt, die alle vier Isoformen von VEGF (121, 165, 189, 206) erkennt. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Kühlschrank. Am nächsten Tag wurde das Färbeverfahren nach einer Aufwärmphase von 30 Minuten bei Raumtemperatur fortgesetzt. Die Proben wurden dreimal für je 2 Minuten in Tris-Puffer gespült, bevor die Benetzung mit dem Sekundärantikörper (DAKO EnVision+, Peroxidase, mouse, K4001) erfolgte. Dieser wurde für 1 Stunde aufgegeben und die Objektträger anschließend für dreimal je 2 Minuten in Tris-Puffer gespült. Nach Zugabe des Farb-Komplexes (DAKO AEC + High sensitivity substrate-chromogen system, K3461) für 30 Minuten konnte das Enzym Peroxidase sichtbar gemacht werden. Zunächst wurde der Farbkomplex sorgfältig abgekippt, es erfolgte noch ein dreimaliges Spülen für je 2 Minuten in destilliertem Wasser und dann das abschließende Eindecken der Proben mit Kaisers Glycerin Gelatine (Chroma BG 031). Bis zur digitalen Dokumentation wurden die Objektträger dunkel gelagert.

Von jedem Präparat wurde eine Kontroll-Färbung angefertigt. Dazu wurden die Kontrollproben anstelle des Primärantikörpers lediglich mit 1% BSA in Tris-Spülpuffer inkubiert. Bezüglich aller anderen Schritte wurde entsprechend der zu untersuchenden Gewebeproben verfahren.

2.5 Histologische Beurteilung

Die histologische Beurteilung erfolgte anhand des MANKIN SCORE [41]. Dazu wurden die mit HE und Safranin-O gefärbten Präparate von zwei unabhängigen Untersuchern jeweils nach vier Gesichtspunkten beurteilt:

Es wurde die Struktur, die Zellverteilung und -dichte, die Anfärbung mittels Safranin-O und die Intaktheit der Knorpel-Knochen-Grenze bewertet. Es wurden Punktwerte zugeordnet und die Einzelpunktwerte addiert. Somit ergaben sich Gesamtpunktwerte zwischen 0 und 14, wobei ein Punktwert von 0 einem histologisch gesunden Gelenkknorpel und ein Punktwert von 14 einer Arthrose im Endstadium entspricht (siehe Tabelle 2).

I	Struktur	Grad
	normal	0
	Oberflächenunregelmäßigkeiten	1
	Pannus, Oberflächenunregelmäßigkeiten	2
	Risse bis in die Übergangszone	3
	Risse bis in die Radiärzone	4
	Risse bis in die verkalkte Zone	5
	komplette Desorganisation	6
II	Zellen	Grad
	normal	0
	diffuse Hyperzellularität	1
	Cloning	2
	Hypozellularität	3
III	Safranin-O-Färbung	Grad
	normal	0
	geringfügige Reduktion	1
	mäßige Reduktion	2
	starke Reduktion	3
	keine Färbung nachweisbar	4
IV	Integrität der Knorpel-Knochengrenze	Grad
	intakt	0
	von Blutgefäßen durchzogen	1

Tabelle 2: Mankin-Score

2.6 Digitale Dokumentation und Bildanalyse

Um die immunhistochemischen Proben dauerhaft digital archivieren zu können, wurden sie mit einer Digitalkamera 3 Tage nach Abschluss der Färbungen fotografiert. Dazu wurde die Kamera Cool-SNAP-Pro Digital Kit TM Version 4.0 (Media Cybernetics, USA) auf dem Photomikroskop III der Firma Carl Zeiss installiert und an einen Computer (Intel Pentium III, Microsoft Windows NT) angeschlossen. Anschließend wurden von allen Proben je 3 repräsentative Bildausschnitte ausgewählt (area = 1391x1039) und Digitalfotos angefertigt. Mit Hilfe spezieller Software (Image-Pro Plus-The Proven Solution TM Version 4.1 for Windows, Media Cybernetics, USA) wurden die einzelnen Bildausschnitte dann ausgewertet. Die Software erkennt und zählt angefärbte Zellkerne. Dazu wählt man manuell einen Bereich eines angefärbten Zellkerns, der dann als Referenzfarbspektrum dient. Hierbei wurde auf möglichst große Ähnlichkeit der Referenzspektren aller auszuwertenden Proben geachtet. Das Programm zeigt dann aufgrund der Referenzfarben alle in Frage kommenden Bereiche farbig an. Zusätzlich wurde der Software eine Mindestgröße von 100 Pixels für die zu zählenden Objekte vorgegeben, um Artefakte auszuschließen. Somit konnte unter Sichtkontrolle des Untersuchers die Zahl der gefärbten und ausgewählten Kerne ausgezählt bzw. überprüft werden.

Anschließend wurde aus den Werten der 3 Aufnahmen je Probe ein Mittelwert gebildet, der als Endergebnis betrachtet wurde.

2.7 Statistik

Für die statistische Auswertung der ermittelten Daten stand ein Computerprogramm (Statistical Package for Social Science 9.0, by SPSS Inc. Chicago, Illinois) zur Verfügung. Um die einzelnen Gruppen miteinander zu vergleichen, wurde mit Hilfe der Software nach Überprüfung auf Varianzgleichheit mit dem Levene-Test der modifizierte T-Test für unabhängige Stichproben und inhomogene Varianzen

durchgeführt. Zudem wurden die untersuchten Merkmale mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten nach Spearman untereinander verglichen. Das Niveau für einen signifikanten Unterschied wurde bei $p < 0,05$ angesetzt. Als Grenzwert, der auf einen hochsignifikanten Unterschied hinwies, wurde $p \leq 0,01$ festgelegt. Die Ergebnisdaten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

3 Ergebnisse

Der Versuch wurde mit 28 gleichaltrigen, ausgewachsenen, weißen Neuseelandkaninchen durchgeführt. Die Tiere hatten bei Versuchsbeginn ein durchschnittliches Gewicht von $4193,75 \text{ g} \pm 298,84\text{g}$. Zum Zeitpunkt der Tötung wogen sie durchschnittlich $4274,64 \text{ g} \pm 462,84\text{g}$. Ein Tier erkrankte vor der Operation und wurde durch ein gesundes ersetzt. Postoperativ kam es bei zwei Kaninchen zur Hämatombildung, die sich aber jeweils ohne Komplikationen zurückbildete. Bei einem Tier entwickelte sich postoperativ eine eitrig Wundinfektion, die bereits nach einmaliger Gabe von 0,8 ml Tardomycel abheilte. Ein weiteres Tier musste aufgrund einer Wunddehiszenz nochmals operiert werden, um in einem zweiten Schritt die Kutis wieder zu verschließen. Ansonsten zeigte sich bei allen anderen Tieren bei den Wundkontrollen ein komplikationsloser Heilungsverlauf.

Zum Zeitpunkt der Tötung war bei 11 Tieren der Gruppe mit erfolgter Kreuzbanddurchtrennung (Gruppe 2) diese auch nachweisbar. Bei einem Tier war nach 12 Wochen Versuchszeit das vordere Kreuzband intakt. Es wurde nicht in die Auswertung aufgenommen. Alle Tiere der Kontrollgruppe und die nicht operierten Tiere (Gruppe 1 und Gruppe 3) wiesen zum Zeitpunkt der Gelenkentnahme ein intaktes vorderes Kreuzband auf.

3.1 Makroskopische Ergebnisse

3.1.1 Ulzerationen des Knorpels

Nach Entnahme der Gelenke wurden die Femurkondylen hinsichtlich des Auftretens von Knorpelschäden beurteilt.

In der Gruppe 2 waren nach 3 Wochen bei 6 Gelenken keine Ulzerationen nachweisbar. Bei einem Gelenk kam es zu kleinflächigen Ulzerationen des Knorpels und bei einem weiteren Gelenk zu großflächigen Ulzerationen. 6 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung waren bereits bei 3 Gelenken kleinflächige und bei einem Gelenk großflächige Ulzerationen erkennbar. Zu diesem Zeitpunkt zeigten 4 Gelenke keine ulzerativen Knorpelschäden. Nach 12 Wochen wies nur noch ein Gelenk keine Ulzeration auf, 2 Gelenke zeigten kleinflächige, 3 Gelenke großflächige Knorpeldefekte.

In der Gruppe 1 waren an allen 24 Gelenken keine Ulzerationen nachweisbar (siehe Abbildung 7).

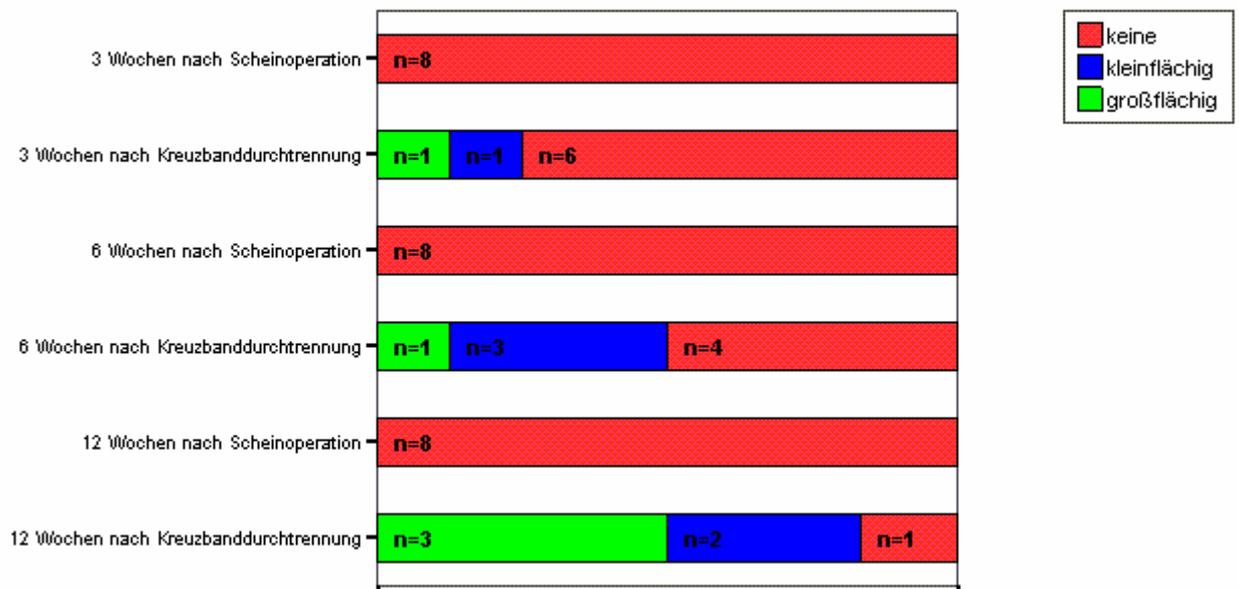


Abbildung 7: Anzahl der Gelenke mit Ulzerationen des Knorpels in Abhängigkeit der Wochen nach Operation

3.1.2 Osteophyten

In der Gruppe 2 war bei allen Gelenken Osteophytenbildung nachweisbar, deren Ausmaß im Versuchsverlauf zunahm. 3 Wochen nach der Kreuzbanddurchtrennung lagen bei 2 Gelenken Osteophyten in geringem und bei 6 Gelenken in mittelgradigem Ausmaß vor. Nach 6 Wochen war es bei 5 Gelenken zu mittelgradigen osteophytären Anbauten und bereits bei 3 Gelenken zu Anbauten in ausgeprägtem Ausmaß gekommen. 12 Wochen nach der Operation lagen bei 2 Gelenken mittelgradige Osteophyten und bei den anderen 4 Gelenken ausgeprägte Osteophyten vor. In der Gruppe 1 waren nach 3 und 12 Wochen an je 2 Gelenken osteophytäre Anbauten nachweisbar, alle anderen Gelenke zeigten keine Veränderungen in dieser Hinsicht (siehe Abbildung 8).

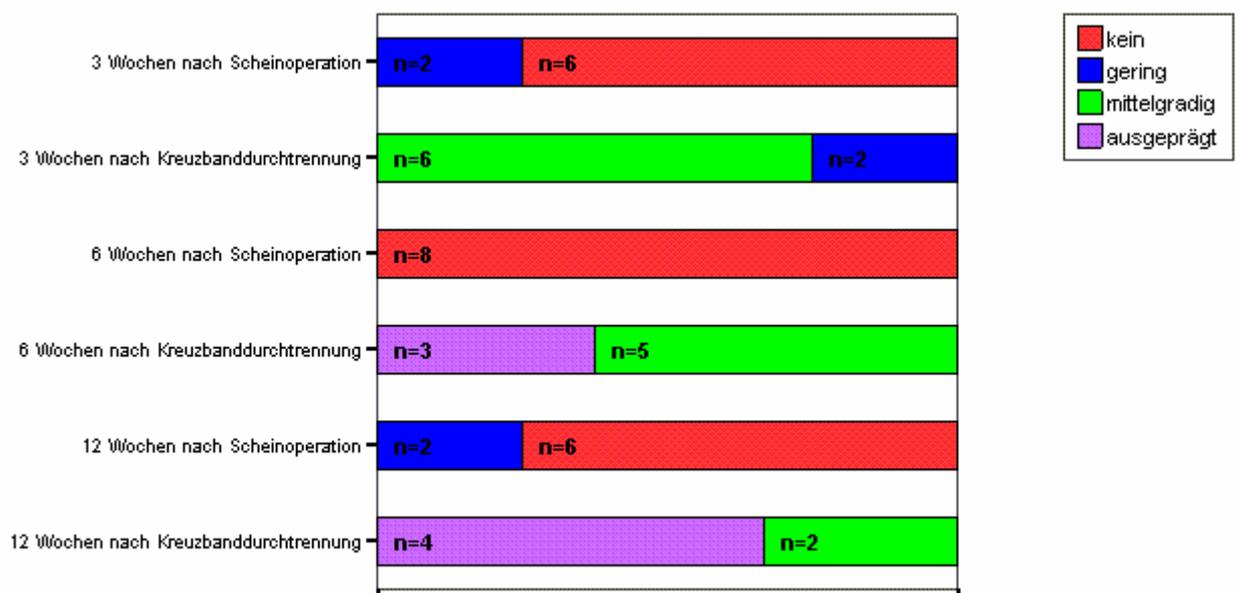


Abbildung 8: Anzahl der Gelenke mit Osteophyten in Abhängigkeit der Wochen nach Operation

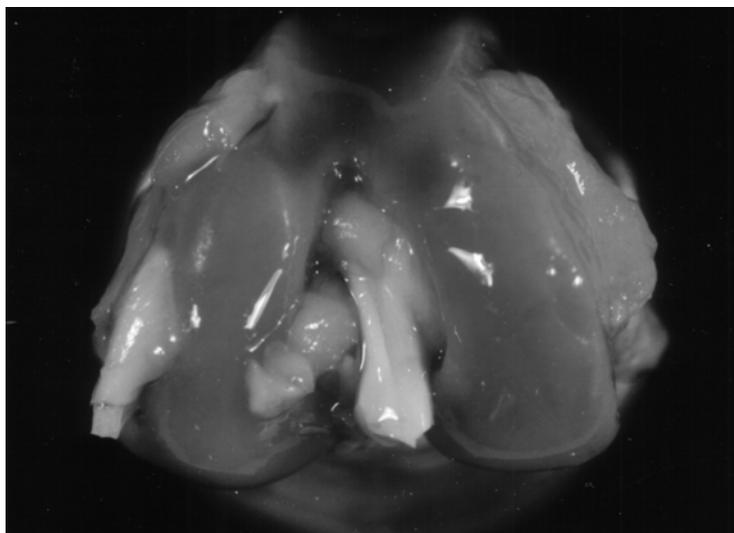


Abbildung 9: intakter Gelenkknorpel beider Femurkondylen eines nicht operierten Tieres

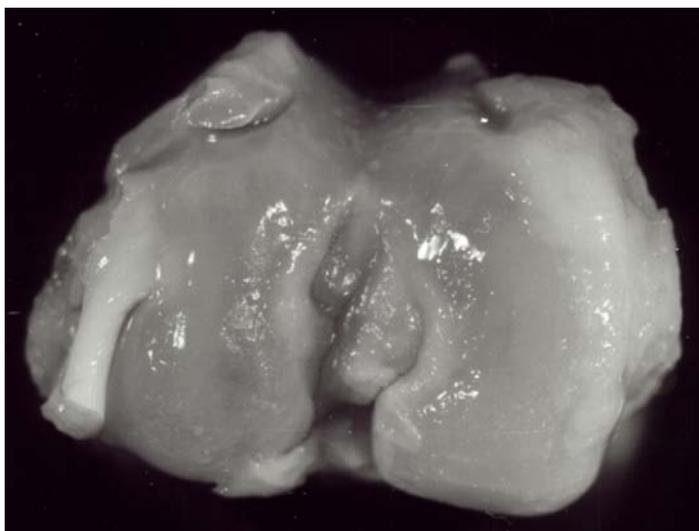


Abbildung 10: deutliche Fibrillationen und Osteophytenbildung beider Femurkondylen (3 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)

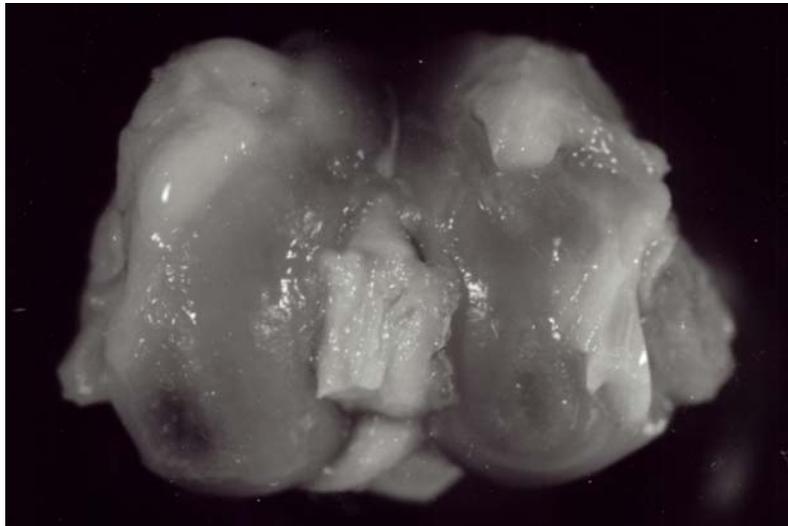


Abbildung 11: beginnende Knorpeldefekte bis auf den Knochen beider Kondylen und ausgeprägte Osteophytenbildung (6 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)

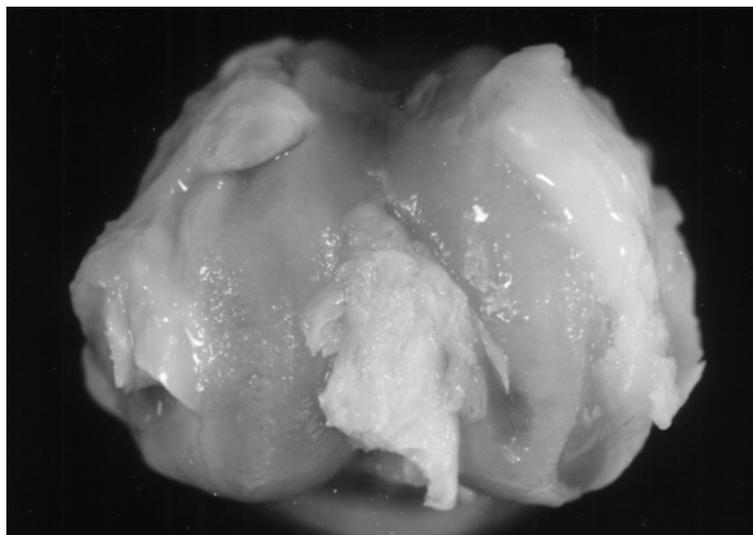


Abbildung 12: deutliche Freilegung des subchondralen Knochens und ausgeprägte Osteophytenbildung (12 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)

3.1.3 Ergussbildung

Der Mengenvergleich der durch Punktion gewonnenen Synovialflüssigkeit ergab in Bezug auf Gelenke aus der Versuchsgruppe 1 keine wesentliche Ergussbildung.

In der Gruppe 2 lagen nach 3 Wochen bei 4 Gelenken ein mittelgradiger und bei 4 Gelenken ein großer Erguss vor. 6 Wochen nach der Operation war bei einem Gelenk keine Ergussbildung nachweisbar, bei einem weiteren Gelenk zeigte sich ein geringer und bei 6 Gelenken ein mittelgradiger Erguss. Nach 12 Wochen wiesen 2 Gelenke einen mittelgradigen und 4 Gelenke einen ausgeprägten Erguss auf (siehe Abbildung 13).

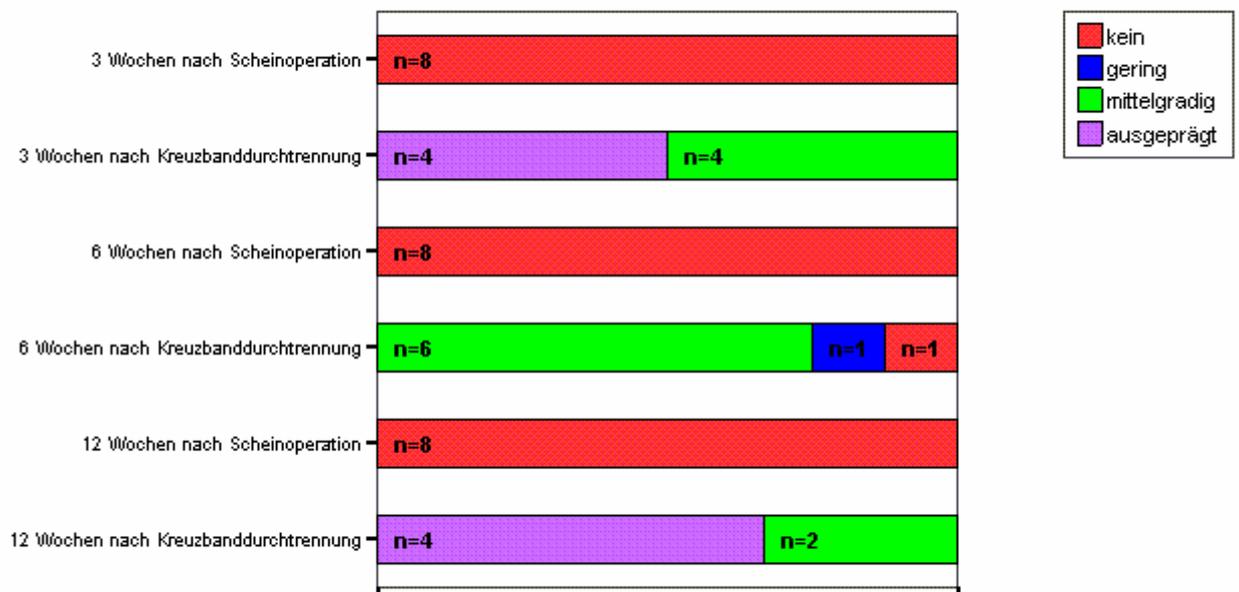


Abbildung 13: Anzahl der Gelenke mit Erguss in Abhängigkeit der Wochen nach Operation

3.1.4 Makroskopischer Arthrosegrad

Bei der Untersuchung der Gelenke auf Anzeichen einer Arthroseentwicklung sind Hinweise auf eine derartige Schädigung sowohl in der Kontrollgruppe (Gruppe 1) als auch in der Gruppe nach Kreuzbanddurchtrennung zu finden. In der Gruppe der nicht operierten Tiere (Gruppe 3) beträgt der Mittelwert des makroskopischen Arthrogrades $0,38 \pm 0,52$. In der Gruppe nach Scheinoperation (Gruppe 1) liegt er nach 3 Wochen bei $0,13 \pm 0,33$, nach 6 Wochen bei $0,63 \pm 0,70$ und nach 12 Wochen bei $0,63 \pm 0,49$. In der Gruppe nach Kreuzbanddurchtrennung (Gruppe 2) wurden signifikant höhere makroskopische Zeichen einer Arthrose ermittelt ($p < 0,01$). Hier liegt der Mittelwert nach 3 Wochen bei $6,81 \pm 1,80$, nach 6 Wochen bei $6,8 \pm 1,9$ und steigt nach 12 Wochen auf $9,5 \pm 0,96$. In dieser Gruppe korreliert der makroskopische Arthrosegrad positiv mit der Zeit, die seit der Operation vergangen ist (Korrelationskoeffizient: $0,52$, $p < 0,05$) (siehe Abbildung 14).

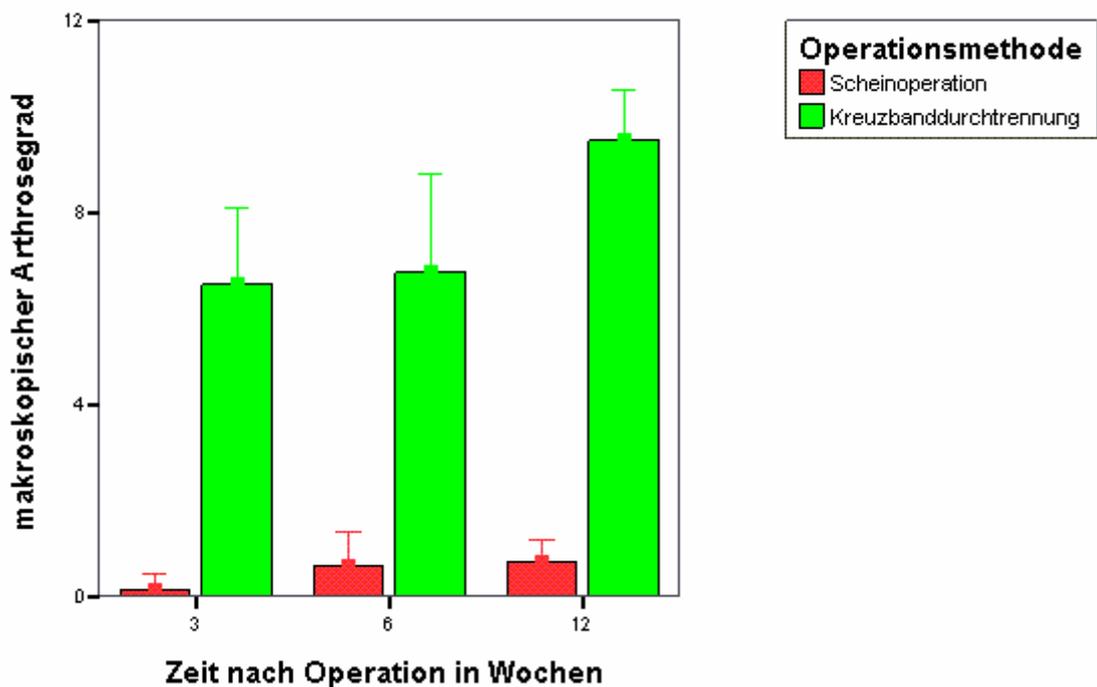


Abbildung 14: Vergleich des makroskopischen Arthrogrades nach Scheinoperation und Kreuzbanddurchtrennung

3.2 Proteoglykanverlust

Mit Hilfe der histologischen Färbeverfahren ist ein Vergleich des Proteoglykanverlustes zwischen den einzelnen Versuchsgruppen möglich. Hier lässt sich in Gruppe 2 ein mit Anzahl der Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung zunehmender Proteoglykanverlust nachweisen. Nach 3 Wochen zeigte ein Gelenk eine geringfügige Reduktion der Proteoglykane, 2 Gelenke eine mäßige Reduktion, 3 Gelenke eine starke Reduktion der Proteoglykane und 2 Gelenke einen totalen Proteoglykanverlust. 6 Wochen nach der Operation war bei 2 Gelenken der Proteoglykanverlust geringfügig, bei einem Gelenk mäßig, bei 4 Gelenken war die Reduktion stark und ein weiteres Gelenk zeigte keine Anfärbung mehr. Nach 12 Wochen war bei 5 Gelenken eine starke Reduktion der Proteoglykananfärbung nachweisbar und bei einem Gelenk die totale Reduktion.

Im Vergleich dazu zeigten die Gelenke der Kontrollgruppe (Gruppe 1) nach 3 Wochen bei 2 Gelenken keine Reduktion der Proteoglykane, 5 Gelenke zeigten eine geringfügige Reduktion und ein Gelenk einen mäßigen Rückgang. 6 Wochen nach der Scheinoperation war bei 3 Gelenken keine Reduktion, bei 4 Gelenken ein geringfügiger und bei einem Gelenk ein starker Proteoglykanverlust nachweisbar. Nach 12 Wochen zeigten 6 Gelenke eine geringfügige Reduktion und 2 Gelenke eine mäßige Reduktion der Proteoglykananfärbung (siehe Abbildung 15).

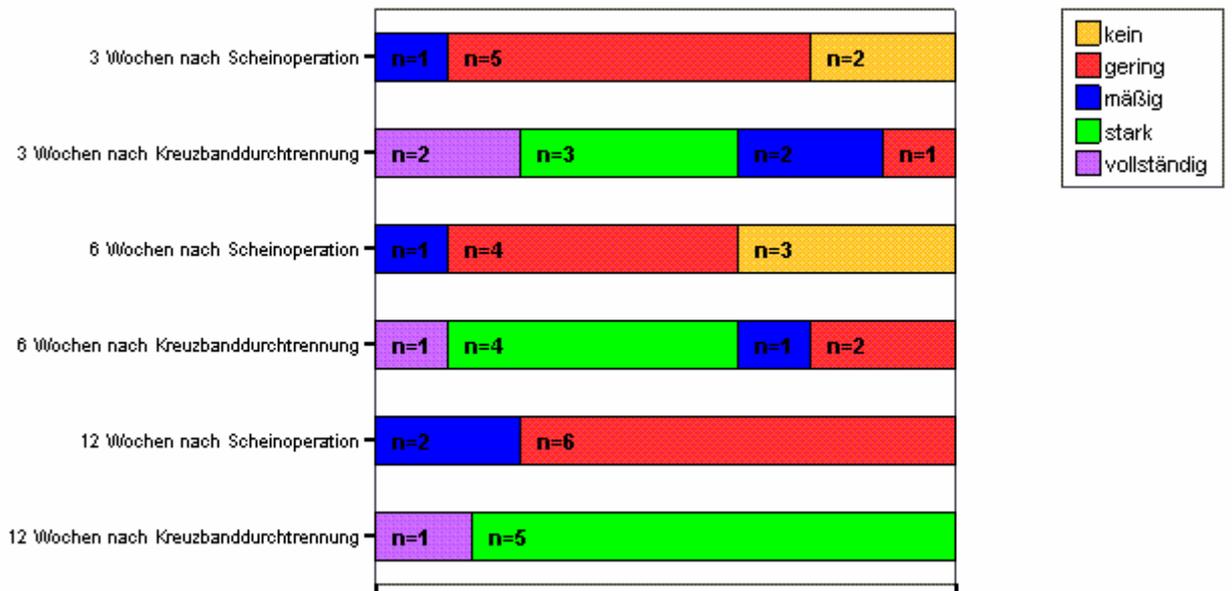


Abbildung 15: Anzahl der Gelenke mit Proteoglykanverlust in Abhängigkeit der Wochen nach Operation



Abbildung 16: kein Proteoglykanverlust im Knorpel eines Tieres aus der Kontrollgruppe (6 Wochen nach Scheinoperation)

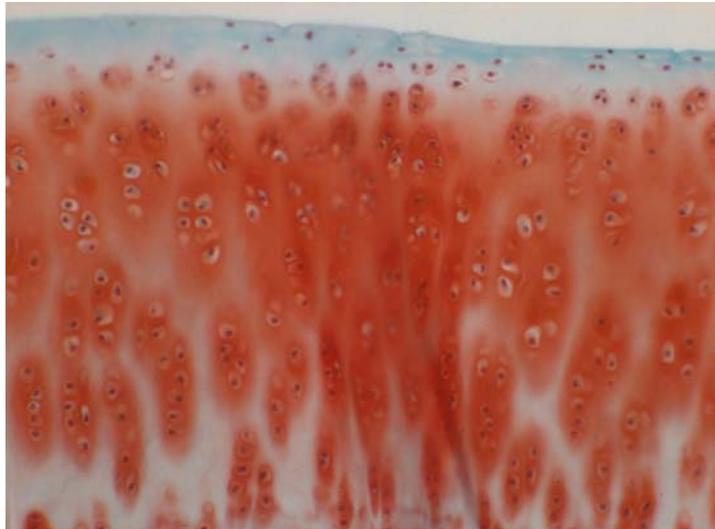


Abbildung 17: geringe Reduktion der Färbungsintensität aufgrund beginnenden Proteoglykanverlustes
(3 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)



Abbildung 18: mäßige Reduktion der Färbungsintensität aufgrund fortgeschrittenen Proteoglykanverlustes
(6 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)

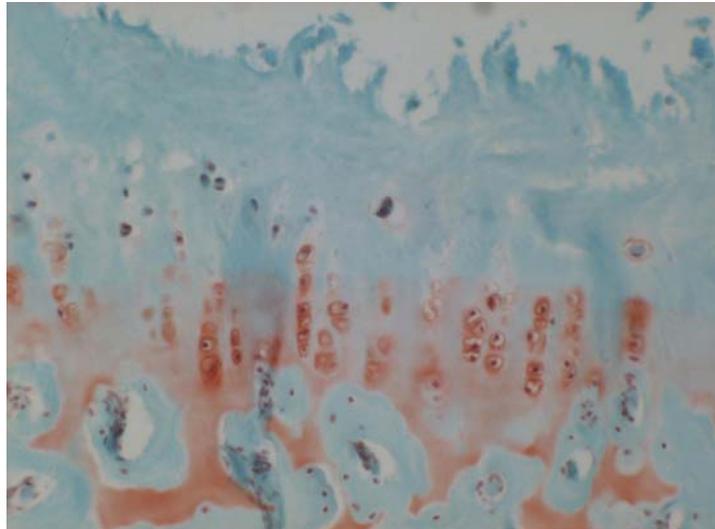


Abbildung 19: starke Reduktion der Färbungsintensität aufgrund fast vollständigen Proteoglykanverlustes
(12 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)

3.3 Histologischer Arthrosegrad

Im Rahmen dieser Studie wurden mittels Mankin-Score die Gelenkflächen von insgesamt 54 Femurkondylen mikroskopisch auf Anzeichen einer Arthrose hin beurteilt. Hinweise auf eine derartige Schädigung sind in allen Gruppen zu finden, wobei in der Gruppe nach Kreuzbanddurchtrennung signifikant höhere histologische Arthrosegrade feststellbar sind ($p < 0,01$). In der Gruppe der nicht operierten Tiere (Gruppe 3) beträgt der Mittelwert des mikroskopischen Arthrosegrades $1,8 \pm 1,58$. In der Kontrollgruppe (Gruppe 1) liegt der Mittelwert des histologischen Arthrosegrades nach 3 Wochen bei $3,3 \pm 0,71$, nach 6 Wochen bei $1 \pm 1,2$ und nach 12 Wochen bei $2,3 \pm 1,17$.

Im Vergleich dazu beträgt der Mittelwert des histologischen Arthrosegrades in der Gruppe nach Kreuzbanddurchtrennung (Gruppe 2) nach 3 Wochen bereits $7,3 \pm 3,62$, nach 6 Wochen $8 \pm 2,89$ und nach 12 Wochen $9,83 \pm 3,06$. Bezogen auf diese Gruppe korreliert die Steigerung des histologischen Arthrosegrades mit der zunehmenden Zeit seit Kreuzbanddurchtrennung (siehe Abbildung).

Insgesamt zeigt sich zudem, dass der makroskopische Arthrosegrad mit dem mikroskopischen Arthrosegrad positiv korreliert (Korrelationskoeffizient: 0,750; $p < 0,01$) (siehe Abbildung 21).

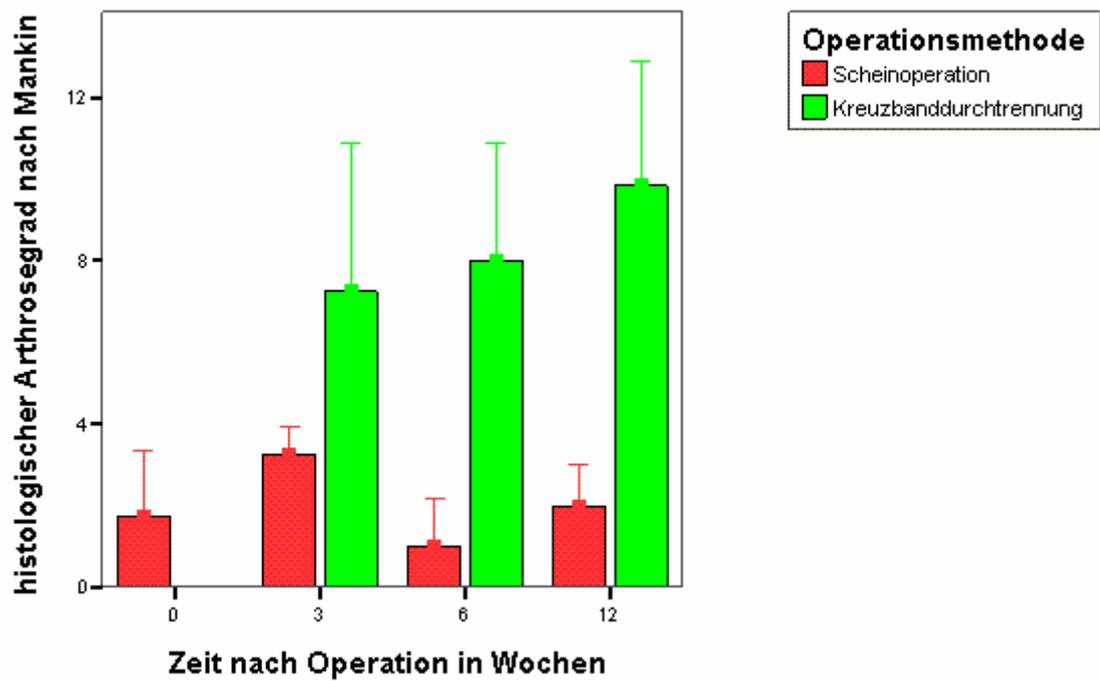


Abbildung 20: Vergleich des histologischen Arthrosegrades nach Scheinoperation und Kreuzbanddurchtrennung

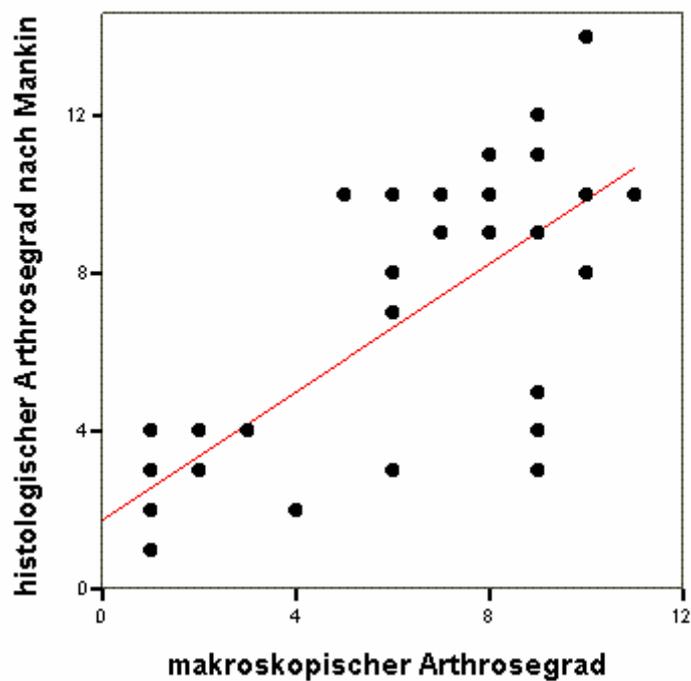


Abbildung 21: Korrelation zwischen dem makroskopischen und histologischen Arthrosegrad

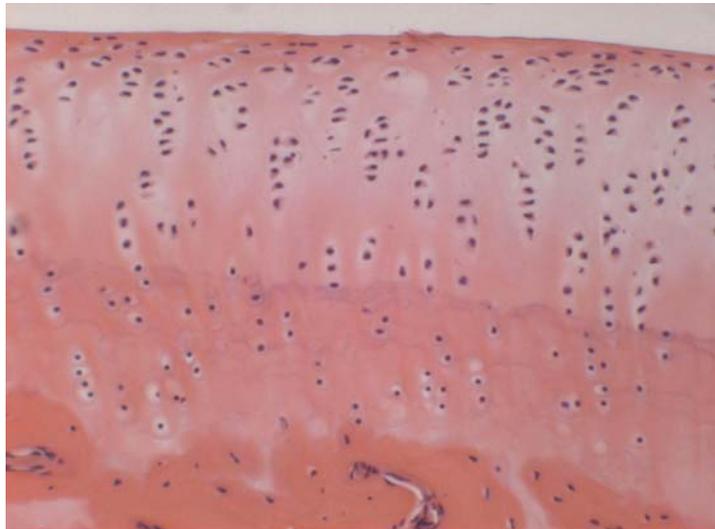


Abbildung 22: histologisches Knorpelbild eines nicht operierten Kaninchens

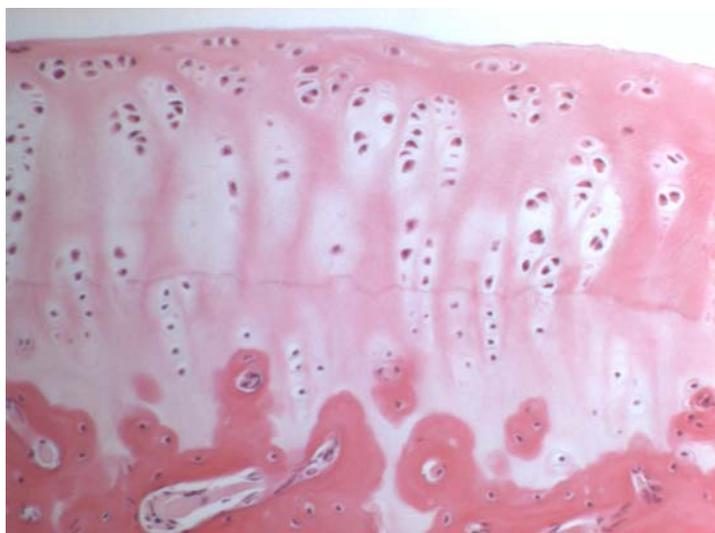


Abbildung 23: beginnende Zerstörung der intakten Knorpelstruktur
(3 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)

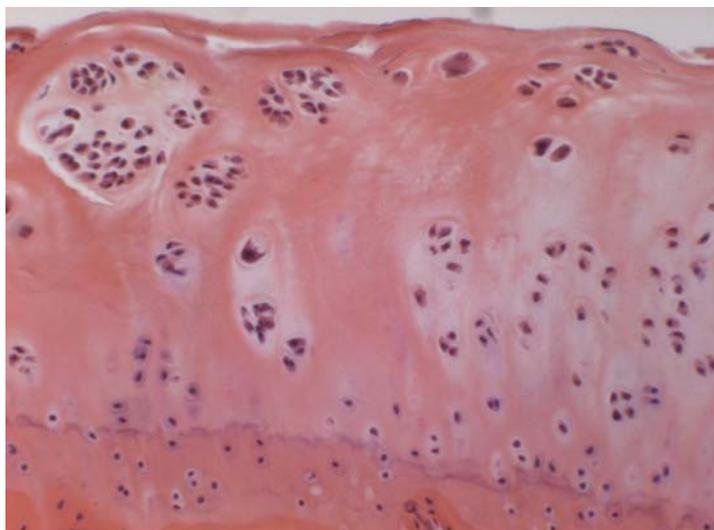


Abbildung 24: völlige Aufhebung der regelgerechten Knorpelarchitektur mit Rissbildung und Clusterbildung (6 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)

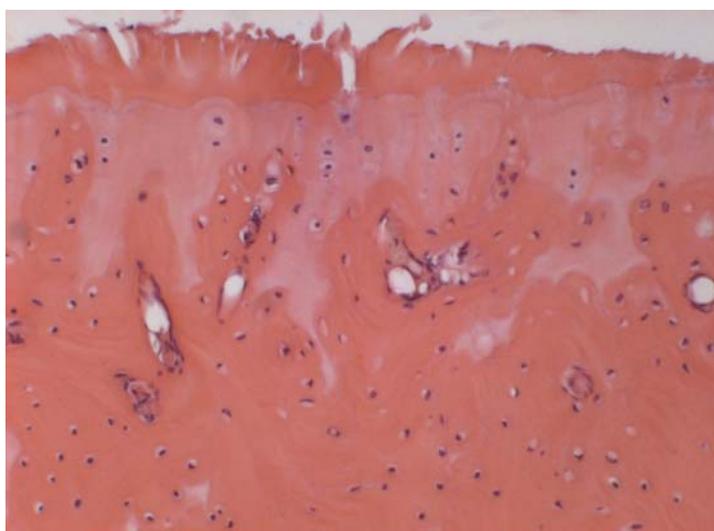


Abbildung 25: tiefe Rissbildung und Zerstörung der Knorpeloberfläche (12 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)

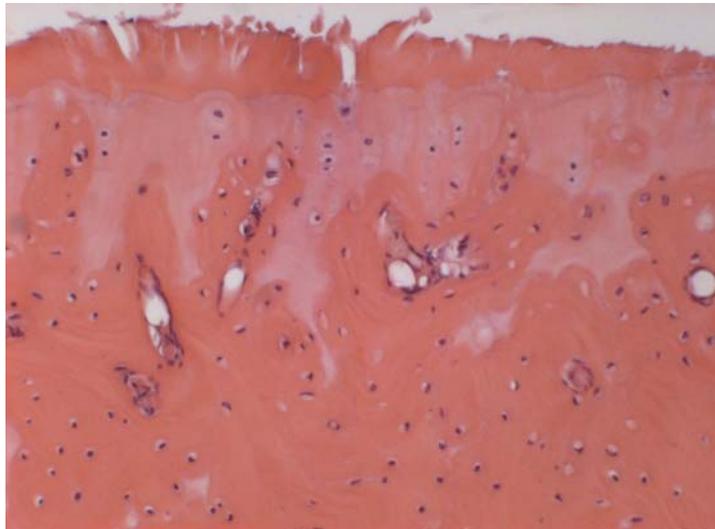


Abbildung 26: vollständiger Verlust des Knorpels bis auf einen schmalen noch verbliebenen Saum

3.4 Immunhistochemische Färbung VEGF

3.4.1 Kontrollen

Von jeder Probe wurde neben der immunhistochemischen Färbung zum VEGF-Nachweis eine Kontroll-Färbung angefertigt. Bei keiner der Kontrollen kann eine spezifische Färbung der Zellen oder des Hintergrundes nachgewiesen werden.



Abbildung 27: Kontrolle

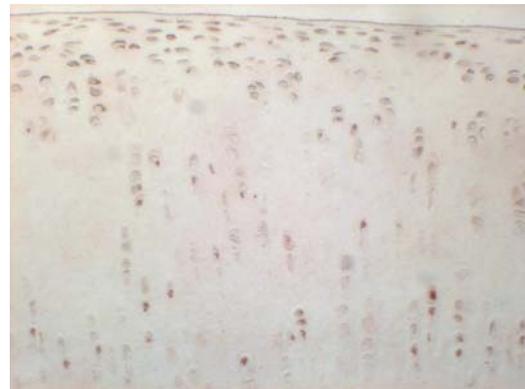


Abbildung 28: Immunhistochemische Färbung

3.4.2 Nachweis von VEGF

In allen Gewebeproben der drei Gruppen lassen sich VEGF-positive Zellen nachweisen. In der Gruppe der nicht operierten Tiere (Gruppe 3) liegt der Anteil der VEGF-positiven Zellen bei $11,95\% \pm 2,55\%$. In der Kontrollgruppe (Gruppe 1) lassen sich in den Proben nach 3 Wochen durchschnittlich $16,23\% \pm 4,68\%$, nach 6 Wochen $11,5\% \pm 5,95\%$ und nach 12 Wochen $11,58\% \pm 3,3\%$ VEGF-positive Zellen nachweisen. Nach Kreuzbanddurchtrennung (Gruppe 2) liegt der Anteil der VEGF-positiven Zellen nach 3 Wochen bei $17,65\% \pm 5,67\%$ und nach 6 Wochen bei $19,45\% \pm 4,57\%$. 12 Wochen nach Operation sind durchschnittlich $21,27\% \pm 5,41\%$ der Chondrozyten VEGF-positiv.

Nach 3 Wochen ist der Unterschied der Mittelwerte VEGF-positiver Zellen zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe noch nicht signifikant ($p = 0,59$). Jedoch besteht bereits nach 6 Wochen und nach 12 Wochen ein signifikanter Unterschied zwischen dem prozentualen Anteil VEGF-positiver Chondrozyten in der Versuchsgruppe und in der Kontrollgruppe ($p = 0,01$ bzw. $p = 0,05$). Insgesamt ergibt der Vergleich der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe signifikant niedrigere Werte der Kontrollgruppe ($p < 0,01$) (siehe Abbildung 29).

In der Gesamtbetrachtung wird bei einem niedrigen mikroskopischen Arthrosegrad auch ein niedriger Anteil VEGF-positiver Chondrozyten nachgewiesen. Es besteht eine signifikant positive Korrelation ($r = 0,767$; $p < 0,01$) (siehe Abbildung 30).

Zwischen dem makroskopischen Arthrosegrad und dem prozentualen Anteil VEGF-positiver Zellen besteht ebenfalls eine signifikante, positive Korrelation ($r = 0,518$; $p = 0,02$) (siehe Abbildung 31). In der Gruppe nach Kreuzbanddurchtrennung (Gruppe 2) kommt es mit zunehmender Zeit seit der Operation auch zur steigenden Anzahl der VEGF-positiven Zellen. Die Korrelation ist positiv, jedoch nicht signifikant ($r = 0,257$, $p = 0,248$).

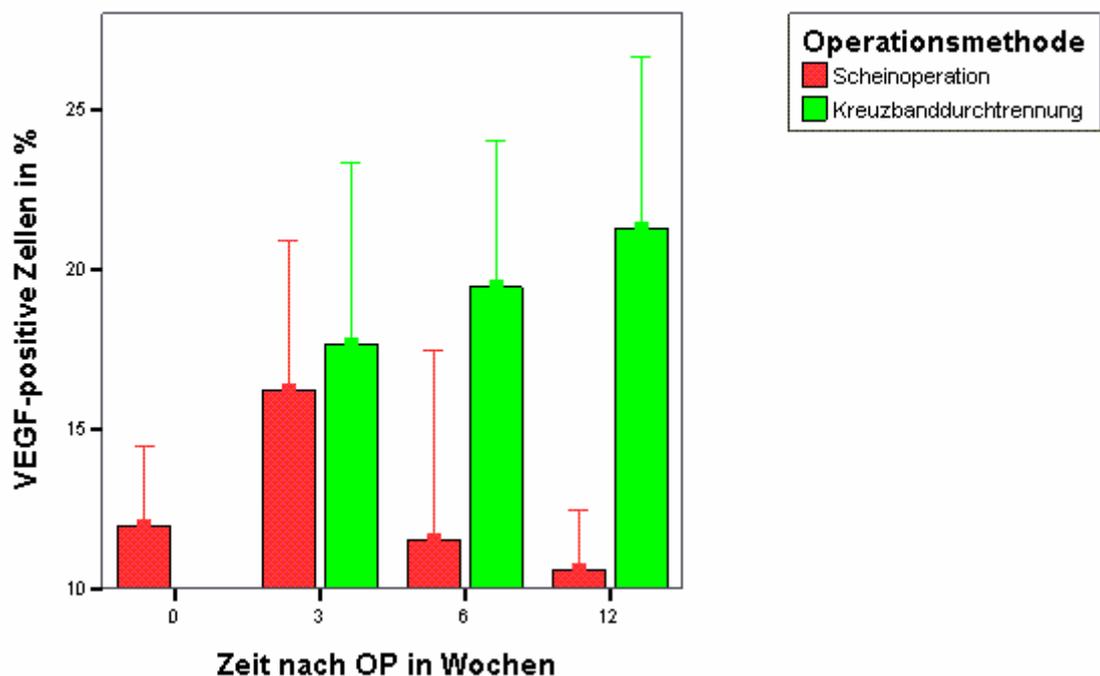


Abbildung 29: Vergleich der VEGF-Expression nach Scheinoperation und Kreuzbanddurchtrennung

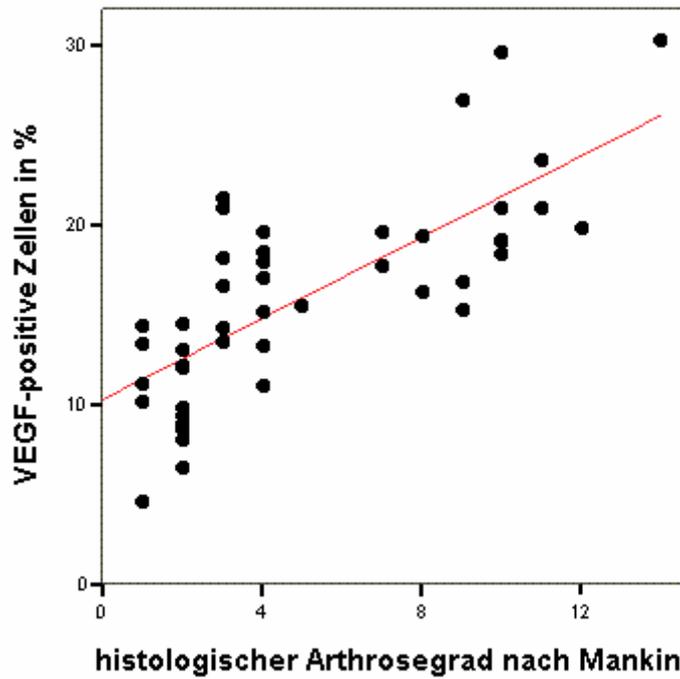


Abbildung 30: Korrelation zwischen dem histologischen Arthrosegrad und der VEGF-Expression

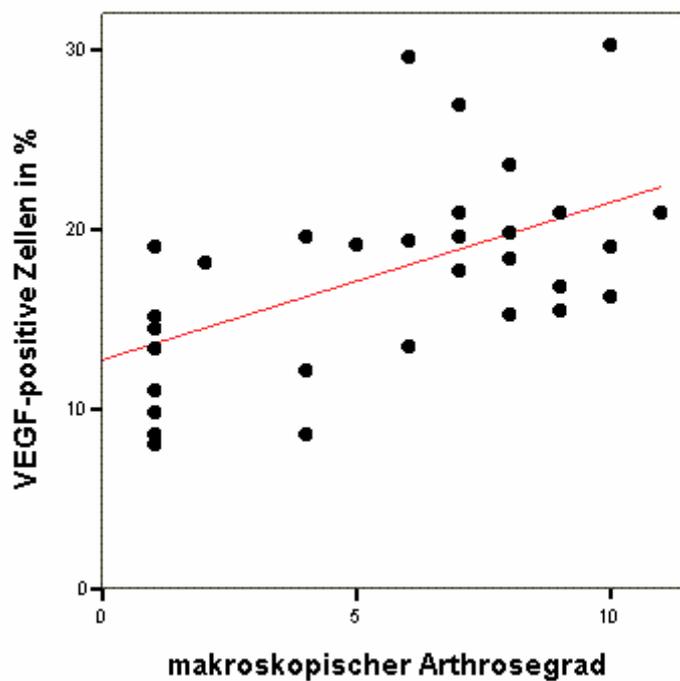


Abbildung 31: Korrelation zwischen dem makroskopischen Arthrosegrad und der VEGF-Expression

Immunhistochemische Bilder

3 Wochen nach Operation

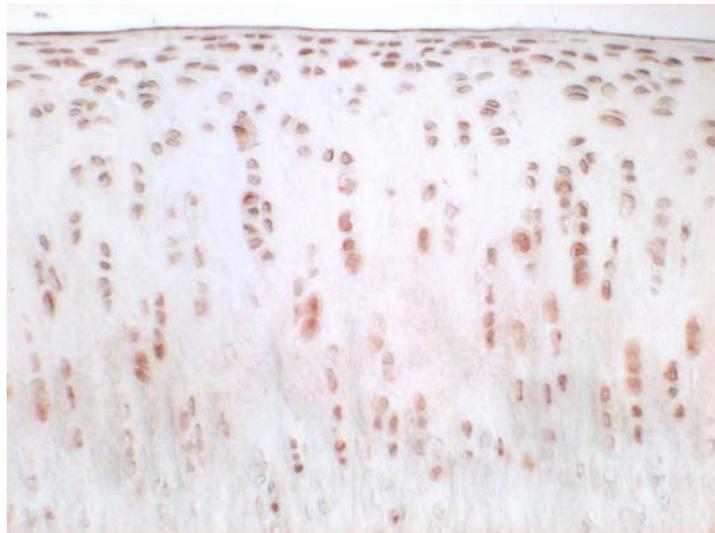


Abbildung 32: VEGF-Expression nach Scheinoperation

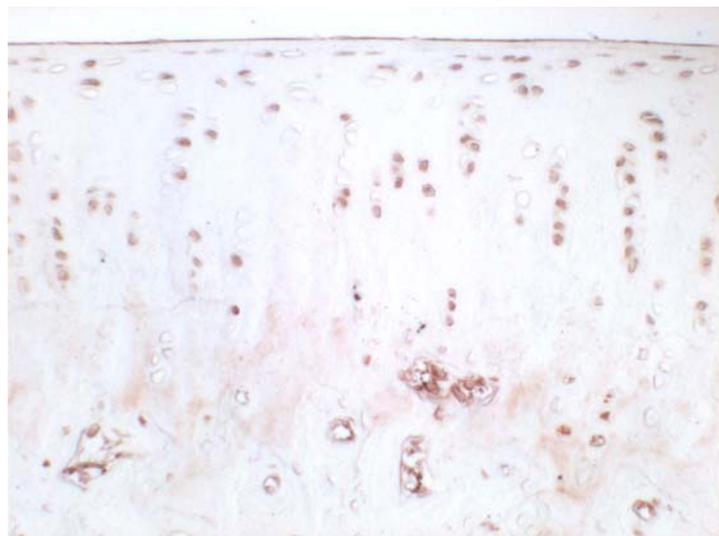


Abbildung 33: VEGF-Expression nach Kreuzbanddurchtrennung

6 Wochen nach Operation

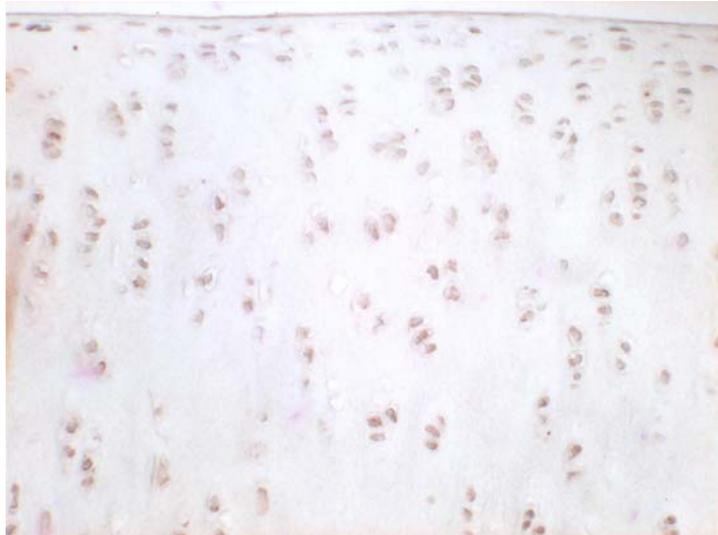


Abbildung 34: VEGF-Expression nach Scheinoperation

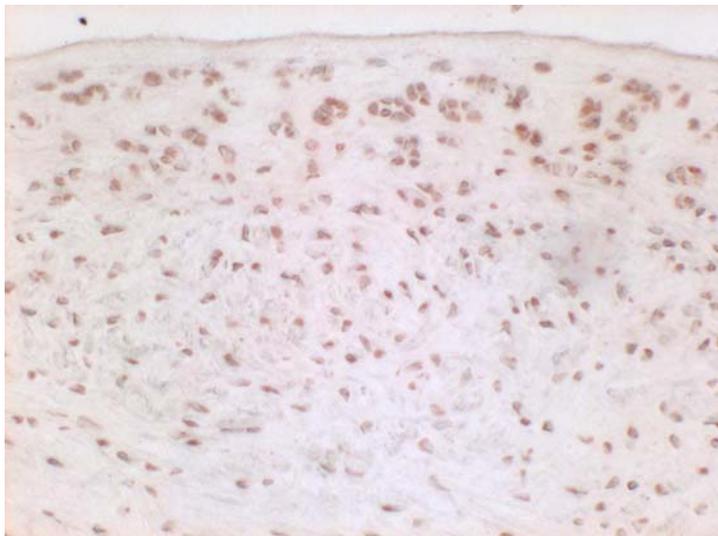


Abbildung 35: VEGF-Expression nach Kreuzbanddurchtrennung

12 Wochen nach Operation

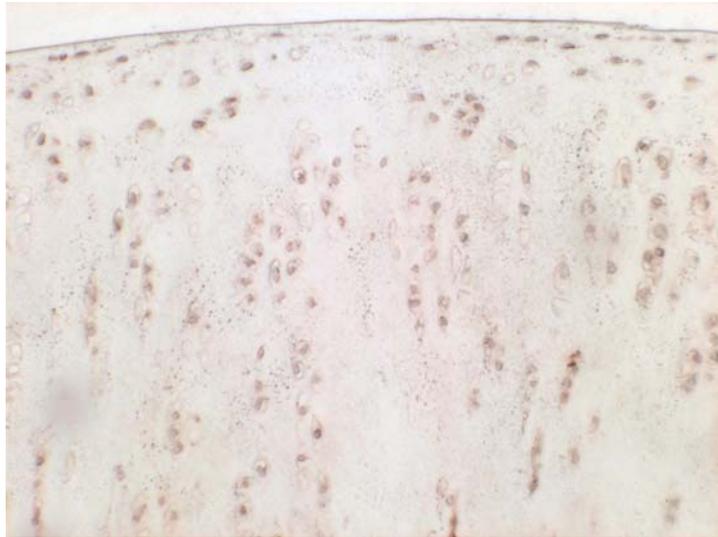


Abbildung 36: VEGF-Expression nach Scheinoperation

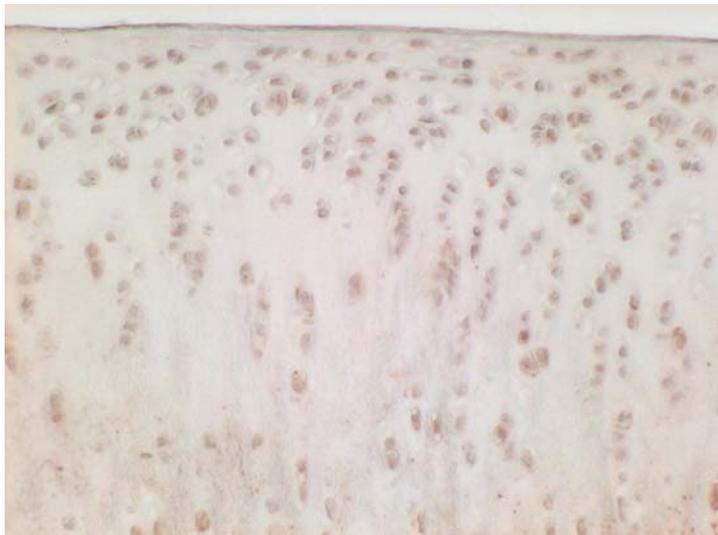


Abbildung 37: VEGF-Expression nach Kreuzbanddurchtrennung

3.4.3 Regionale Verteilung der VEGF-Expression

In den von uns untersuchten Gewebeproben ist eine immunhistochemische Anfärbung der VEGF-positiven Chondrozyten vorzugsweise im Bereich der oberflächlichen Knorpelschichten sowie der Übergangszone nachweisbar. Mit Zunahme der makroskopisch und histologisch nachweisbaren degenerativen Veränderungen kommt es im Bereich der Knorpelzellcluster wie auch in den tiefen Regionen bis hin in die verkalkte Zone zur deutlich erkennbaren VEGF-Expression. Im Rahmen dieser Untersuchung kann zudem ein Zusammenhang zwischen der Ausprägung der Osteophytenbildung und dem Ausmaß der VEGF-Expression dokumentiert werden. Es besteht eine signifikant positive Korrelation ($r = 0,651$; $p < 0,01$).

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 Tiermodellauswahl

Beim Menschen entziehen sich die frühen Krankheitsstadien der Untersuchung, vor allem da die Patienten zu diesem Zeitpunkt noch symptomfrei sind. Die zeitliche Verlaufsbestimmung eines biochemischen Markers wie VEGF in der Entwicklung einer Arthrose kann daher reproduzierbar nur im tierexperimentellen Versuchsaufbau erfolgen. Zu diesem Zweck bieten sich unterschiedliche Modelle an. Für die Untersuchung von experimentell induzierter Arthrose finden sich in der Literatur Beobachtungen an Gelenken von Schafen [38], Hunden [21, 62, 86], Meerschweinchen [3, 75] und Ratten [59]. Studien am Neuseelandkaninchen bieten sich aufgrund der niedrigen Kosten für Unterbringung und Futter an. Diese Tiergattung liefert auch aufgrund der Gelenkgröße ausreichend Knorpelmaterial, um derartige Untersuchungen durchzuführen [6, 7].

Für die modellhafte Untersuchung einer sich entwickelnden Arthrose im Kniegelenk des Kaninchens sind verschiedene Verfahren denkbar. Man unterscheidet zwischen chemisch und mechanisch induzierter Arthrose.

Zur chemischen Induktion wird Papain, Zymokin, Monoiodacetat oder Interleukin 1 β in das betreffende Gelenk injiziert [26, 29, 32]. Allerdings birgt diese Methode die Schwierigkeit, dass die chemische Entstehung einer Arthrose mit keiner Form beim Menschen vergleichbar ist. Zudem steht insbesondere die Induktion mittels Interleukin 1 β im Gegensatz zu einem möglichen Einfluss auf die biochemische Zielvariable VEGF [76].

Eine mechanisch induzierte Arthrose kann durch Denervierung des Gelenks [56], Immobilisation [32], direkte Zerstörung des Gelenkknorpels mit dem Skalpell [50] oder Destabilisierung des Gelenks ausgelöst werden, wobei die letztgenannte

Methode die Arthroseentwicklung beim Menschen am ehesten simuliert. Zwar ahmt sie nur den kleinen Anteil der sekundären posttraumatischen Arthrosen nach, aber aufgrund der fehlenden Erkenntnis über die Ursachen kann für eine primäre Arthrose kein Modell gefunden werden.

Die Bandbreite der Möglichkeiten zur Destabilisierung reicht von der Resektion eines Meniskus über die Resektion beider Menisken, des vorderen Kreuzbandes, beider Kreuzbänder, der Seitenbänder bis hin zu verschiedenen Kombinationen der genannten Methoden [47, 49, 77, 82]. Je nach Vorgehen entsteht im Experiment dann nach kurzer oder längerer Zeit eine Knorpelschädigung. Das Ausmaß der Degeneration hängt zudem von unterschiedlichen Faktoren wie Tierart oder Alter, Geschlecht und Gewicht der einzelnen Tiere ab [7]. So ist darauf zu achten, dass die Epiphysenfuge bereits gesichert geschlossen ist. Moskowitz et al. [49] führten eine Studie an jungen, weiblichen Kaninchen durch, wobei sich nach partieller medialer Menishektomie relativ schnell (durchschnittlich nach 12 Wochen) deutliche arthritische Veränderungen entwickelten. In einer Studie von Shapiro et al. [77] hingegen benötigten die einjährigen Versuchstiere nach totaler medialer Menishektomie bis zu 7 Monate, um Knorpelveränderungen in vergleichbarem Ausmaß zu entwickeln.

Aufgrund der angeführten Argumente fiel die Wahl für diese Studie auf das Neuseelandkaninchen. Die Arthrose wurde experimentell mittels Destabilisierung durch Durchtrennung des vorderen Kreuzbandes induziert. Dies ist ein beim Menschen häufiges Verletzungsmuster, das abhängig von Zeit und Alter zu einer Gonarthrose führt [71].

Wie die Literatur zeigt, hat sich das gewählte Studienmodell in der Arthroseforschung bereits häufig bewährt [90].

4.1.2 Probenentnahme

Beim Menschen gibt es innerhalb eines Gelenks Stellen, an denen es bei Arthrose bevorzugt zu makroskopisch sichtbaren, degenerativen Veränderungen kommt [12]. Dies spiegelt sich auch im Tiermodell sowohl makroskopisch wie auch

mikroskopisch wider [77], wobei die geschädigten Bereiche und die Ausdehnung der Knorpelschädigung mit den biomechanischen Parametern zusammenhängen. In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, wie bedeutsam es ist, die zu untersuchenden Proben immer aus dem gleichen Areal zu entnehmen [85]. So untersuchten Chang et al. [6] die Femurkondylen und das Tibiaplateau von elf Neuseelandkaninchen in Hinblick auf das Ausmaß der arthrotischen Veränderungen nach Durchtrennung des vorderen Kreuzbandes. Sie fanden heraus, dass die Knorpelschädigung im Bereich des medialen Femurkondylus am ausgeprägtesten und häufigsten vorkommt. Mankin et al. [41] wiesen in ihrer Studie an menschlichen Femurköpfen mit arthrotischen Veränderungen bei der Untersuchung verschiedener Areale nach, dass bereits innerhalb eines Gelenks große Unterschiede im Ausmaß der Arthrosegrade bestehen. Infolgedessen wurde für die vorliegende Studie jeweils der mediale Femurkondylus entnommen und untersucht.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Arthroseentstehung nach Kreuzbanddurchtrennung

In der vorliegenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass das gewählte Studiendesign geeignet ist, um Arthrose zu induzieren. Dazu wurden insgesamt 46 Gelenke auf mikroskopische und makroskopische Anzeichen einer Arthroseentstehung untersucht. Innerhalb der Gruppe nach Kreuzbanddurchtrennung (Gruppe 2) zeigten die Proben degenerative Veränderungen, die mit der Zeit progredient waren. Bereits 3 Wochen nach der Operation zeigten 75 % der untersuchten Gelenke deutliche Anzeichen einer Arthrose. 12 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung wiesen 88 % der Proben tiefe Knorpeldefekte auf. Auch die Zunahme der Osteophytenbildung und Ergussbildung, die Veränderungen der Chondrozyten sowie der zunehmende Proteoglykanverlust sind als Zeichen für die schnell progredienten degenerativen Veränderungen zu werten. Colombo et al. [7] untersuchten 40 Versuchstiere auch in Hinblick auf die

Reduktion der Proteoglykane, wobei die Ergebnisse nahelegten, dass es aufgrund eines Anstiegs lysosomaler Enzyme seitens des zerstörten Gewebes zu einem Verlust der Färbbarkeit des naheliegenden Gewebes kommt. Die vorliegenden Ergebnisse sind mit den Veränderungen vorheriger in der Literatur beschriebenen Studien [1, 6] vergleichbar, auch in Hinblick auf die Entwicklung bei der Arthrose des Menschen [70]. Allerdings ist die Varianz innerhalb der Versuchsgruppe hoch. So waren bereits nach 3 Wochen an 2 von 8 Gelenken sehr hohe Arthrosegrade nachweisbar, während 12 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung auch relativ niedrige Arthrosegrade auftraten. Derartige Abweichungen innerhalb eines Untersuchungszeitraums beschreiben auch Vignon et al. [85] in ihrer Studie von 1987, sie können unterschiedlich begründet sein. So zeigten Mankin et al. [41] bereits 1971 anhand der Untersuchung von 13 menschlichen Femurköpfen, dass schon innerhalb eines Gelenks, insbesondere bei weit fortgeschrittener Arthrose, große Unterschiede in Bezug auf die histologischen und biochemischen Zeichen der Knorpeldegeneration bestehen. In manchen Fällen führt die Operation zu einer ausgedehnten Entzündungsreaktion, welche wiederum durch Narbenzüge eine Festigung bedingt und somit der Instabilität und Arthrose entgegenwirkt. Des Weiteren gibt es beim Menschen individuell variierende Disposition zur Arthroseentstehung [27], die auch beim Kaninchen vorhanden sein könnte.

Im Vergleich mit der Versuchsgruppe zeigten sich bei der Kontrollgruppe und der Gruppe der nicht operierten Tiere (Gruppe 1 und 3) nur geringe arthrotische Veränderungen, die zudem im Versuchsverlauf nicht progredient waren. Um einen Einfluss der Operation selbst auf die Arthroseentstehung auszuschließen, wurde die Kontrollgruppe mit der Gruppe der nicht operierten Tiere verglichen, die Resultate entsprechen sich in etwa. Mikroskopisch wie makroskopisch zeigen mehr als 50 % der Gelenke aus der Kontrollgruppe keine Anzeichen einer Arthrose. Bei keinem Gelenk wurde ein Arthrosegrad über 4 (Score nach Mankin et al. [41]) erhoben. Die Veränderungen, die in vereinzelt Fällen auffällig waren, sind also eher auf spontan auftretende degenerative Entwicklungen zurückzuführen denn auf den Einfluss der Scheinoperation. Derartige Anzeichen konnten zudem bei einem Tier aus Gruppe 3 festgestellt werden. Die ermittelten Ergebnisse korrelieren mit einer Studie von 1997 von Chang et al. [6], in der der Einfluss verschiedener Entnahmestellen untersucht wurde.

Um eine Fehlinterpretation der Ergebnisse aufgrund der oben diskutierten Faktoren auszuschließen, wurde im Rahmen dieser Studie der Korrelationskoeffizient der histologischen und makroskopischen Arthrosegrade bestimmt. Da eine positive Korrelation zwischen diesen beiden Variablen besteht, können die Ergebnisse der histologischen Auswertung als repräsentativ angesehen werden.

4.2.2 VEGF

Während des Wachstums fördern hypertrophe Chondrozyten durch die Produktion von VEGF die Gefäßeinsprossung in die Zone des hypertrophen Knorpels der Epiphysenfuge, allerdings kommt dieser Prozess im Erwachsenenalter zum Stillstand. Es wurde bereits gezeigt, dass es im Fall der Osteoarthritis zu einer lokalen Differenzierung von Chondrozyten zu hypertrophen Zellen kommt [87]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass osteoarthritische Chondrozyten ebenfalls VEGF produzieren können. Dies trägt zur entzündlichen Reaktion der Synovialmembran bei. Die Synovialzellen proliferieren und es entsteht ein geschwulstartiges Gewebe, der so genannte Pannus, von dem aus dann Blutgefäße in das darunterliegende Knorpelgewebe einwachsen. Einige Autoren gehen davon aus, dass eine subklinische Synovitis bereits mit einer Osteoarthritis vergleichbar ist und diese eng verbunden mit der zunehmenden Rate an Angiogenese in osteoarthrotischen Knie- und Hüftgelenken ist [27]. Da ein solches Entzündungsgeschehen der Synovialmembran nicht erst bei Patienten mit ausgedehnten radiologisch nachweisbaren Gelenkzerstörungen oder im Endstadium der Osteoarthritis dokumentiert werden kann, sind auch Studien notwendig, deren Augenmerk im Frühstadium der Arthrose liegt, um den Einfluss von Entzündung und Angiogenese auf den Verlauf der Gelenkschädigung zu beurteilen. Eine Studie von Sato et al. [73] konnte zeigen, dass zusammen mit der Steigerung der VEGF-Expression auch das Ausmaß der Synovitis bei Patienten mit Fehlbelastungen des Kiefergelenks zunimmt. Haywood et al. [27] führten eine Studie an Gewebeproben von 104 Patienten durch, die aufgrund von Osteoarthritis

eine Hüft- oder Kniegelenks-Endoprothese erhielten oder sich einer Arthroskopie unterzogen. Es besteht nach ihrer Untersuchung eine positive, signifikante Korrelation ($p < 0,01$) zwischen der Makrophageninfiltration, Angiogeneese und dem Entzündungsgrad. Der chemotaktische Faktor wird dabei von VEGF-exprimierenden Zellen der Synovialmembran sezerniert [37]. Die Produktion von VEGF durch Synovialmakrophagen ist somit ein molekularer Mechanismus, der zum Fortschreiten der Angiogeneese und Entzündung in der Synovialmembran bei Osteoarthrose beiträgt.

Es liegt nahe, dass die Produktion von VEGF durch die Chondrozyten eine wichtige Determinante ist, um den Endothelzellen bei Arthrose das Einwandern aus dem Pannus-Gewebe in das degenerativ geschädigte Knorpelgewebe zu erleichtern. Die vorliegende Studie konnte am Kaninchenmodell der experimentell induzierten Arthrose nachweisen, dass sowohl Chondrozyten im gesunden wie auch im arthrotisch veränderten Gewebe VEGF exprimieren. Dabei ist der Prozentsatz im pathologisch veränderten Gewebe deutlich höher. In allen Gewebeproben konnten sowohl VEGF-negative als auch VEGF-positive Knorpelzellen dokumentiert werden.

In der Gruppe der scheinoperierten Tiere war nach 3 Wochen die VEGF-Expression im Vergleich zur Gruppe der nicht operierten Tiere signifikant erhöht. Der Vergleich zwischen der Gruppe nach Scheinoperation einerseits und nach Kreuzbanddurchtrennung andererseits jeweils nach 3 Wochen ergab keinen signifikanten Unterschied. Dies lässt sich mit dem Einfluss der Operation selber und der damit verbundenen allgemeinen Entzündungsreaktion erklären. Verschiedene Studien konnten bereits den deutlichen Zusammenhang zwischen den physiologischen Vorgängen bei Wundheilung und der Expression von VEGF nachweisen [19, 78].

Im weiteren Lauf der experimentellen Arthrose am Kaninchenmodell zeigte sich dann ein signifikanter Unterschied von Kontroll- und Versuchsgruppe. Zudem nahm innerhalb der Versuchsgruppe der Anteil der positiven Zellen im Laufe der Zeit stetig zu. Dabei korrelierte in der Gesamtbetrachtung der Anteil an VEGF-positiven Zellen signifikant mit dem makroskopischen wie mikroskopischen Ausmaß der degenerativen Veränderungen.

Damit wird die Annahme verschiedener Autoren [27, 63] bestätigt, dass es in den späteren Stadien der Osteoarthritis durch hypertrophe Chondrozyten zu einer vermehrten Expression von VEGF im pathologisch veränderten Knorpel kommt. Im Rahmen der Angiogenese werden Endothelzellen angezogen. Durch den Einfluss dieses Proteins auf die Endothelzellen werden Signalkaskaden ausgelöst, die dazu führen, dass Zytokine, Proteinase und andere Mediatoren gebildet werden. Diese wiederum beeinflussen Chondrozyten, Chondroklasten und Osteoblasten [20].

Da in gesundem Knorpelgewebe - in der vorliegenden Studie kurz nach dem operativen Eingriff in verstärktem Maße - ebenfalls VEGF exprimiert wird, liegt hier ebenfalls eine angiogene Wirkung nahe. Verschiedene Studien konnten jedoch zeigen, dass normale Chondrozyten im Gegensatz zu hypertrophen und osteoarthritischen Chondrozyten antiangiogene Peptide sezernieren [13, 51, 63]. Das Vorkommen derartiger Angiogenese-Inhibitoren könnte erklären, warum Knorpel normalerweise ein avaskuläres Gewebe ist.

Die immunhistochemischen Färbungen der vorliegenden Studie für VEGF zeigen eine kräftige Anfärbung der Zellmembran und Teilen des Zellinneren der Chondrozyten. In der 2003 von Shakibaei et al. [76] durchgeführten Studie an humanem Gewebe wurde die Verteilung eines VEGF-Rezeptors (VEGFR-3) in osteoarthritisch geschädigtem Gelenkknorpel untersucht. Die Autoren fanden in allen Proben pathologisch veränderten Gewebes eine deutliche immunhistologische Färbung. Insbesondere im Bereich der Zellcluster sowie der Knorpelerosionen waren hypertrophe Chondrozyten anfärbbar. Der Farbstoff wurde überwiegend im Bereich der Zellmembran und Teilen des Zellinneren gebunden. In einigen Proben konnte bei den Chondrozyten der oberflächlichen Zone eine Polarisation der VEGFR-3-Expression in Richtung des subchondralen Knochengewebes dokumentiert werden. Vergleichbare Ergebnisse erhielten Enomoto et al. [13]. Bei der Auswertung legten sie besonderen Wert auf die Verteilung der VEGF-positiven Chondrozyten im Knorpelgewebe. So wiesen sie 2003 in ihrer Studie an menschlichem Knorpelgewebe in nahezu allen Proben im oberflächlichen Bereich und in der Übergangszone die Expression von VEGF nach. Wenn der Knorpel tiefe Fissuren und Knorpelzell-Cluster aufwies, konnte in diesen Bereichen ebenfalls eine immunhistochemische Färbung dokumentiert werden. In den von uns untersuchten Gewebeproben war ebenfalls eine immunhistochemische Anfärbung der VEGF-

positiven Chondrozyten vorzugsweise in den beschriebenen Bereichen erkennbar. Mit zunehmendem Arthrosegrad fiel die beschriebene Verteilung deutlicher auf. Pufe et al. [63] untersuchten arthrotisch geschädigtes Gewebe von menschlichen Spendern und fanden in Abhängigkeit vom Schweregrad der Schädigung eine verschiedene Verteilung der VEGF-positiven Zellen. Im Fall geringer bis moderater Schädigung (Mankin Score 1-5) beschränkte sich die immunhistochemische Färbung auf die intra- und perizelluläre Matrix der oberflächlichen Chondrozyten. In Gewebeproben mit moderaten bis schweren degenerativen Veränderungen (Mankin-Score 6-14) wurden die Chondrozyten der oberflächlichen, tiefen und verkalkten Knorpelschicht positiv für VEGF angefärbt. Pfander et al. [61] fanden in Rahmen ihrer Studie in allen Schichten des gesunden wie arthritisch geschädigten Knorpels VEGF. Besonders im Bereich der Knorpelzell-Cluster an der Gelenkoberfläche zeigte sich eine vermehrte immunhistochemische Anfärbung. In den tieferen Knorpelschichten konnte bei manchen Proben eine geringe, nicht signifikante Abnahme der Färbung dokumentiert werden. Außerdem fanden Pfander et al. bei der Untersuchung der Gewebeproben aus menschlichen Kniegelenken interindividuelle Unterschiede der VEGF-Expression zwischen den einzelnen Spendern, die nicht mit dem Schweregrad der Arthrose korrelierten. Die Färbeergebnisse der vorliegenden Studie sind mit diesen Färbeergebnissen vergleichbar. Auch im Rahmen unserer Studie konnten bezüglich der VEGF-Expression innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen interindividuelle Abweichungen festgestellt werden. Darüber hinaus fielen auch innerhalb der einzelnen Proben regionale Unterschiede in der VEGF-Expression auf. Diese Beobachtung konnte unabhängig vom Tötungszeitpunkt nach der Operation gewonnen werden.

Derartige Abweichungen innerhalb eines Gelenkes zeigten bereits 1971 auch Mankin et al. [41] anhand ihrer Untersuchung von 13 menschlichen Femurköpfen. Sie wiesen innerhalb eines Gelenks, insbesondere bei weit fortgeschrittener Arthrose, große Unterschiede in Bezug auf die histologischen und biochemischen Zeichen der Knorpeldegeneration nach.

In der von Enomoto [13] an humanen Gewebeproben durchgeführten Studie bestand eine signifikante, positive Korrelation zwischen dem Anteil der VEGF-positiven Chondrozyten und den histologisch nachweisbaren Veränderungen aufgrund der

Osteoarthritis. Die Ergebnisse der Untersuchung menschlichen Gewebes untermauert die vorliegende Studie im Kaninchenmodell. Auch hier wurde eine signifikante Korrelation zwischen dem histologischen Arthrosegrad nach Mankin und der VEGF-Expression festgestellt. Aufgrund dieser engen Verknüpfung zwischen den einzelnen Parametern könnte man die VEGF-Expression auch als möglichen Marker der histomorphologischen Veränderungen in arthrotischem Knorpelgewebe verwenden. Ferner konnte in dieser Studie zwischen dem makroskopischen Arthrosegrad und der Anzahl VEGF-positiver Zellen eine signifikante Korrelation festgestellt werden.

Pufe et al. [63] nahmen auf das menschliche Kniegelenk bezogen eine Abhängigkeit der Osteophytenbildung von der VEGF-Expression an. Die genauere Betrachtung dieses Einzelkriteriums liefert im Rahmen unserer Untersuchung für die Ausprägung von Osteophyten im Vergleich mit der VEGF-Expression ebenfalls eine signifikante, positive Korrelation. Ähnliche Ergebnisse erhielten Hashimoto et al. [24]. Sie untersuchten die Entwicklung und Regelung der Osteophytenbildung am Kaninchenmodell und konnten zeigen, dass hypertrophe Chondrozyten in Osteophyten VEGF exprimieren. Das ist ein essentielles Signal zur Regelung der Chondrozyten-Differenzierung und triggert den Knorpelumbau und die Osteophytenbildung. Vier Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung waren in allen Gelenken im Bereich der Femurkondylen Osteophyten nachweisbar. Ein Teil der hypertrophen Chondrozyten war VEGF-positiv. Neun Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung exprimierte eine große Zahl der Knorpelzellen VEGF. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass VEGF ein wichtiges Peptid in der Regulation der Osteophytenbildung ist.

Das Wissen um die zentrale Rolle von VEGF in der Angiogenese führte zu der Hypothese, dass die Hemmung dieses Peptids einen effektiven Ansatz darstellen könnte, um malignes Geschehen sowie andere Vorgänge in Zusammenhang mit pathologischer Angiogenese zu therapieren. Klinische Untersuchungen konnten beim Menschen bereits den Einfluss eines solchen Antikörpers gegen VEGF auf verschiedenen Karzinomen bestätigen [17]. Gerber et al. [20] untersuchten die Therapiemöglichkeiten in Verbindung mit VEGF im Rahmen der Knochenentwicklung. Während des Wachstums inaktivierten sie VEGF bei jungen Mäusen durch Blockade des zugehörigen Rezeptors. Im Rahmen dieser Studie

fanden sie heraus, dass bei den behandelten Tieren die Femurlänge nach zwei bis drei Wochen signifikant vermindert war. Allerdings waren die VEGF-Inhibition und die resultierenden Konsequenzen innerhalb von zwei Wochen wieder reversibel.

In früheren Studien wurde nachgewiesen, dass VEGF chemotaktisch auf kultivierte Osteoblasten wirkt [46]. Um eine derartige Wirkung von VEGF in vivo zu beleuchten, untersuchen Street et al. [79] 2002 die lokale Wirkung von VEGF auf die Knochenheilung am Tiermodell. Ihre Studie legt eine deutliche Steigerung der Heilungsgeschwindigkeit gerade zu Beginn der Kallusbildung nahe, so dass Patienten mit Veränderungen in der VEGF-Regulation oder fraglicher Prognose der Knochenschädigung einen Therapievorteil haben könnten.

Die vorliegende Studie zeigt einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Expression von VEGF und den pathologischen Veränderungen des Knorpels bei Osteoarthritis. Im Rahmen der Entwicklung der degenerativen Veränderungen bei Osteoarthritis spielt VEGF eine bedeutende Rolle. Dabei wirkt es als wichtiger Botenstoff der Angiogenese. Bereits in frühen Stadien der Gelenkveränderungen kommt es zur VEGF-Expression. Mit Zunahme der makroskopisch und histologisch nachweisbaren degenerativen Veränderungen kann dann eine signifikante Erhöhung dieses Parameters dokumentiert werden.

Aufgrund der Erkenntnisse aus den verschiedenen Studien sind auch im Fall der Osteoarthritis medikamentöse Therapiekonzepte denkbar. Weitere Studien sind nötig, um den Einfluss dieses Proteins auf die pathophysiologischen Vorgänge im arthrotischen Knorpel zu klären.

5 Zusammenfassung

Vorangegangene Studien legen eine Beteiligung von VEGF an der Pathogenese der Arthrose nahe. Über die Rolle dieses Zytokins in der Frühphase der Arthroseentwicklung ist bisher jedoch nur wenig bekannt.

Ziel der vorliegenden Studie war es, herauszufinden, welche Rolle VEGF in der Entwicklung einer experimentell induzierten Arthrose am Kaninchen gelenk spielt.

Im Rahmen dieser Studie wurde 12 ausgewachsenen Neuseelandkaninchen das vordere Kreuzband reseziert, 12 weitere erhielten lediglich eine Scheinoperation, bei der das Kniegelenk eröffnet, gespült und wieder verschlossen wurde. Aus beiden Gruppen wurden jeweils nach 3, 6 und 12 Wochen je 4 Tiere getötet und die Kniegelenke entnommen. 4 weitere Tiere wurden ohne vorherige Operation getötet und die Kniegelenke wurden ihnen ebenfalls entnommen. Alle Gelenke wurden in Hinblick auf makroskopische Zeichen einer Arthroseentwicklung untersucht sowie mikroskopisch mit Hilfe des Mankin-Score beurteilt. Des Weiteren erfolgte eine immunhistochemische Anfärbung der VEGF-exprimierenden Zellen.

Nach Kreuzbanddurchtrennung konnte makroskopisch und histologisch eine Zunahme der Arthrosezeichen sowie immunhistochemisch eine Steigerung der VEGF-Expression nachgewiesen werden. Sowohl im Fall der Versuchs- wie auch der Kontrollgruppe korrelierte der makroskopische Arthrosegrad signifikant und positiv mit der seit der Operation vergangenen Zeit ($r = 0,52$, $p < 0,05$). Insgesamt lag jeweils eine signifikante, positive Korrelation zwischen dem makroskopischen und histologischen Arthrosegrad ($r = 0,750$, $p < 0,01$), zwischen der VEGF-Expression und dem histologischen Arthrosegrad ($r = 0,767$, $p < 0,01$) sowie auch zwischen der VEGF-Expression und dem makroskopischen Arthrosegrad ($r = 0,518$, $p < 0,02$) vor. Dabei wiesen Gelenke mit deutlicher Osteophytenbildung ebenfalls eine signifikant gesteigerte VEGF-Expression auf.

Diese Studie zeigt eine Steigerung der VEGF-exprimierenden Chondrozyten im zeitlichen Verlauf. Da zusätzlich auch ein enger Zusammenhang mit den makroskopisch und histologisch nachweisbaren Knorpelveränderungen besteht, ist eine wichtige Rolle von VEGF in der Frühphase der Arthroseentwicklung anzunehmen.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Adams ME, Brandt KD (1991): Hypertrophic repair of canine articular cartilage in osteoarthritis after anterior cruciate ligament transection. *J Rheumatol* 18(3): 428-435
- 2 Amin A, Abramson S (1998): The role of nitric oxide in articular cartilage breakdown in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 10(3): 263-268
- 3 Bendele AM (1987): Progressive chronic osteoarthritis in femorotibial joints of partial medial meniscectomized guinea pigs. *Vet Pathol* 24(5): 444-448
- 4 Bucher O, Wartenberg H (1997): Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Verlag Hans Huber, 12. vollständig überarbeitete Auflage, S. 126-128
- 5 Bullough PG, Jagannath A (1983): The morphology of the calcification front in articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br* 65(1): 72-78
- 6 Chang DG, Iverson EP, Schinagl RM, Sonoda M, Amiel D, Coutts RD, Sah RL (1997): Quantitation and localization of cartilage degeneration following the induction of osteoarthritis in the rabbit knee. *Osteoarthritis Cartilage* 5(5): 357-372
- 7 Colombo C, Butler M, O'Byrne E, Hickman L, Swartzendruber D, Selwyn M, Steintz B (1983): A new model of osteoarthritis in rabbits. I. Development of knee joint pathology following lateral meniscectomy and section of the fibular collateral and sesamoid ligaments. *Arthr Rheum* 26 (7): 875-886
- 8 Debrunner AM (1995): Orthopädie, 3. vollständig überarbeitete Auflage. S. 422-429
- 9 Denko CW, Boja B, Moskowitz RW (1990): Growth promoting peptides in osteoarthritis: insulin, IGF-1, growth hormone. *J Rheumatol* 17(9): 1217-1221
- 10 Eastgate JA, Symons JA, Wood NC (1988): Correlation of plasma interleukin-1 levels with disease activity in rheumatoid arthritis. *Lancet* 2(8613): 706-709

- 11 Eckhart L, Ban J, Ballaun C, Weniger W, Tschackler E (1999): Reverse transcription-polymerase chain reaction products of alternatively spliced mRNAs form heteroduplexes and heteroduplexe complexes. *J Biol Chem* 274(5): 2613-2615
- 12 Emery IH, Meachim G (1973): Surface morphology and topography of patello-femoral cartilage fibrillation in Liverpool necropsies. *J Anat* 116(1): 103-120
- 13 Enomoto H, Inoki I, Komiya K, Shiomi T, Ikeda E, Obata K, Matsumoto H, Toyama Y, Okada Y (2003): Vascular endothelial growth factor isoforms and their receptors are expressed in human osteoarthritic cartilage. *Am J Pathol* 162(1): 171-181
- 14 Schmidt U (2004): *Pressemitteilungen BMGS* 2/2004
- 15 Fenton MJ, Buras JA, Donnelly RP (1992): IL-4 reciprocally regulates IL-1 and IL-1 receptor antagonist expression in human monocytes. *J Immunol* 149(4): 1283-1288
- 16 Ferrara N (1999): Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 77(7): 527-543
- 17 Ferrara N (2002): Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol* 29(6): 10-14
- 18 Folkman J (1995): Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med* 1(1): 27-31
- 19 Frank S, Hubner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S (1995): Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem* 270(21): 12607-12613
- 20 Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kolwalski J, Werb Z, Ferrara N (1999): VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 5(6):623-628
- 21 Gilbertson EM (1975): Development of periarticular osteophytes in experimentally induced osteoarthritis in the dog. *Ann Rheum Dis* 34(1): 12-25
- 22 Glansbeek HL, van Beuningen HM, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB (1998): Stimulation of articular cartilage repair in established

- arthritis by local administration of TGF β into murine knee joints. *Lab Invest* 78(2): 133-142
- 23 Harada M, Mitsuyama K, Yoshida H, Sakisaka S, Taniguchi E, Kawaguchi T, Ariyoshi M et al. (1998): Vascular Endothelial Growth Factor in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Scand J Rheumatol* 27(5):377-380
 - 24 Hashimoto S, Creighton-Achermann L, Takahashi K, Amiel D, Coutts RD, Lotz M (2002): Development and regulation of osteophyte formation during experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 10(3): 180-187
 - 25 Hashimoto S, Ochs RL, Rosen F, Quach J, Mc Cabe G, Solan J, Seegmiller JE, Terkeltaub R, Lotz M (1998): Chondrocyte-derived apoptotic bodies and calcification of articular cartilage. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(6): 3094-3099
 - 26 Havdrup T, Telhag H (1977) Papain-induced changes in the knee joints of adult rabbits. *Acta Orthop Scand* 48(2): 143-149
 - 27 Haywood L, McWilliams DF, Pearson CI, Gill SE, Ganesan A, Wilson D, Walsh DA (2003): Inflammation and Angiogenesis in Osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 48(8): 2173-2177
 - 28 Howell DS, Altman RD (1993): Cartilage repair and conservation in osteoarthritis. A brief review of some experimental approaches to osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 19(3): 713-724
 - 29 Hulth A, Lindberg L, Telhag H (1970): Experimental osteoarthritis in rabbits. Preliminary report. *Acta Orthop Scand* 41(5): 522-530
 - 30 Ibelgaufts H (1995): Dictionary of Cytokines. VHC Verlagsgesellschaft
 - 31 Ikeda M, Hosoda Y, Hirose S, Okada Y, Ikeda E (2000): Expression of vascular endothelial growth factor isoforms and their receptors Flt-1, KDR and neuropilin-1 in synovial tissues of rheumatoid arthritis. *J Pathol* 191(4): 426-433
 - 32 Jortikka MO, Inkinen RI, Tammi MI (1997): Immobilisation causes long-lasting matrix changes both in the immobilised and contralateral joint cartilage. *Ann Rheum Dis* 56(4): 255-261
 - 33 Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K, Kimura A, Satow Y (1995): Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in haematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res* 55(23): 5687-5692

- 34 Kaipainen A, Korhonen J, Pajusola K, Aprelikova O, Persico MG, Terman BI, Alitalo K (1993): The related FLT4, FLT1 and KDR receptor tyrosine kinases show distinct expression patterns in human fetal endothelial cells. *J Exp Med* 178(6): 2077-2088
- 35 Kuwata K, Sato S, Era S, Sogami M, Kida K, Iwama T, Kato K, Matsunaga T, Watari H (1997): Cross-relaxation times of normal and biochemical induced osteoarthritic rabbit knee cartilages. *Jpn J Physiol* 47(3): 291-297
- 36 Leonhardt H (1990): *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*, 8. überarbeitete und erweiterte Auflage. Thieme Verlag, S. 134-137
- 37 Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N (1989): Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246(4935): 1306-1309
- 38 Little C, Smith S, Ghosh P, Belleger C (1997): Histomorphological and immunohistochemical evaluation of joint changes in a model of osteoarthritis induced by lateral meniscectomy in sheep. *J Rheumatol* 24(11): 2199-2209
- 39 Lotz M, Guerne PA (1991): Interleukin-6 induces the synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 / erythroid potentiating activity (TIMP-1 / EPA). *J Biol Chem* 266(4): 2017-2020
- 40 Mäkinen T, Veikkola T, Mustjoki S, Karpanen T, Catimel B, Nice EC, Wise L, Mercer A, Kowalski H, Kerjaschki D, Stacker SA, Achen MG, Alitalo K (2001): Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signal via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *EMBO J* 20(17): 4762-4773
- 41 Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A (1971): Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am* 53(3): 523-537
- 42 Mansour JM, Wentorf FA, Degoede KM (1998): In vivo kinematics of the rabbit knee in unstable models of osteoarthrosis. *Ann Biomed Eng* 26(3): 353-360
- 43 Martel-Pelletier J (1998): Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 6(6): 374-376

- 44 Mc Quillan DJ, Handley CJ, Robinson HC (1986): Control of proteoglycan biosynthesis. Further studies on the effect of serum on cultured bovine articular cartilage. *Biochem J* 237(3):741-747
- 45 Mc Quillan DJ, Handley CJ, Campell MA, et al. (1986): Stimulation of proteoglycan synthesis by serum and IGF-1 in cultured bovine articular cartilage. *Biochem J* 240(2): 423-430
- 46 Midy V, Plouet J (1994): Vasculotropin/vascular endothelial factor induces differentiation in cultured osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 199(1): 380-386
- 47 Minns RJ, Muckle DS (1982): The role of the meniscus in an instability model of osteoarthritis in the rabbit knee. *Br J Exp Pathol* 63(1): 18-24
- 48 Mohle R, Green D, Moore MA, Nachman RL, Rafii S (1997): Constitutive production and thrombin-induces release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(2): 663-668
- 49 Moskowitz RW, Davis W, Sammarco J, Martens M, Baker J, Mayor M, Burstein A, Frankel V (1983): Experimentally-induced degenerative joint lesions following partial meniscectomy in the rabbit. *Arthr Rheum* 16(3): 397-405
- 50 Moskowitz RW (1972): Experimental models of degenerative joint disease. *Semin Arthritis Rheum* 2(1): 95-116
- 51 Moses MA, Wiederschain D, Wu I, Fernandez CA, Ghazizadeh V, Lane WS (1999): Troponin I is present in human cartilage and inhibits angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(6): 2645-2650
- 52 Nagashima M, Yoshino S, Aono H, Takai M, Sasano M (1999): Inhibitory effects of anti-rheumatic drugs on vascular endothelial growth factor on cultured rheumatoid synovial cells. *Clin Exp Immunol* 116(2):360-365
- 53 Nakahara H, Song J, Sugimoto M, Hagihara K, Kishimoto T, Yoshizaki K, et al. (2003): Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48(6):1521-1529
- 54 Nauck M, Roth M, Tamm M, Eickelberg O, Wieland H, Stulz P, Perruchoud AP (1997): Induction of vascular endothelial growth factor by platelet-

- activating factor and platelet-derived growth factor is down-regulated by corticosteroids. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16(4):389-406
- 55 Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z (1999): Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 13(1): 9-22
- 56 O'Connor BL, Visco DM, Brandt KD (1989): The development of experimental osteoarthritis in dogs with extensively deafferented knee joints. *Arthritis Rheum* 32 (Suppl. 4): 106
- 57 Osborn KD, Trippel SB, Mankin HJ (1989): Growth factor stimulation of adult articular cartilage. *J Orthop Res* 7(1): 35-42
- 58 Palmoski M, Perricone E, Brandt KD (1997): Development and reversal of a proteoglycan aggregation defect in normal canine knee cartilage after immobilization. *Arthritis Rheum* 22(5): 508-517
- 59 Pearson CM (1956): Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Proc Soc Exp Biol Med* 91(1): 95-100
- 60 Petersen W, Tsokos M, Pufe T (2002): Expression of VEGF121 and VEGF165 in hypertrophic chondrocytes of the human growth plate and epiphyseal cartilage. *J Anat* 201(2): 153-157
- 61 Pfander D, Körtje D, Zimmermann R, Weseloh G, Kirsch T, Gesslein M, Cramer T, Swoboda B (2001): Vascular endothelial growth factor in articular cartilage of healthy and osteoarthritic human knee joints. *Ann Rheum Dis* 60(11): 1070-1073
- 62 Pond MJ, Nuki G (1973): Experimentally-induced osteoarthritis in the dog. *Ann Rheum Dis* 32 (4): 387-388
- 63 Pufe T, Petersen W, Tillmann B, Mentlein R (2001): The splice variants VEGF 121 and VEGF 189 of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor are expressed in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 44(5):1082-1088
- 64 Pufe T, Petersen W, Tillman B, Mentlein R (2001): Expression of the vascular endothelial growth factor in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 44(5): 1082-1088
- 65 Pufe T, Petersen W, Tillman B, Mentlein R (2001): The splice variants VEGF121 and VEGF165 are expressed in synovium of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 28(7): 1482-1486

- 66 Radin EL, Paul IL (1971): Response of joints to impact loading. I. In vitro wear. *Arthritis Rheum* 14(3):356-362
- 67 Rickard DJ, Gowen M: Cytokines in arthritis. Arthritis and Rheumatism Council 1993
- 68 Robinson CJ, Stringer SE (2001): The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 114(Pt 5): 853-865
- 69 Rössler H, Rüther W (2000): Orthopädie, 18. Auflage. Urban & Fischer, S. 155-158
- 70 Roos H, Lauren M, Adalbert T, Roos EM, Jonsson K, Lohmander LS (1998): Knee osteoarthritis after meniscectomy: prevalence of radiographic changes after twenty-one years, compared with matched controls. *Arthritis Rheum* 41(4): 687-693
- 71 Roos H, Adalberth T, Dahlberg L, Lohmander LS (1995): Osteoarthritis of the knee after injury to the anterior cruciate ligament or meniscus: the influence of time and age. *Osteoarthritis Cartilage* 3(4): 261-267
- 72 Sandell LJ., Aigner T (2001): Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: Cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res* 3(2): 107-113
- 73 Sato J, Sagami N, Suzuki T, Kaneyama K, Yoshitake Y, Nishikawa K (2002): The expression of vascular endothelial growth factor in synovial tissues in patients with internal derangement of the temporomandibular joint. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 93(3): 251-256
- 74 Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K (1997): Anatomie - Zytologie, Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen, 7. Auflage, Springer Verlag
- 75 Schwartz ER, Leveille C, Oh WH (1981): Experimentally induced osteoarthritis in guinea pigs: effect of surgical procedure and dietary intake of vitamin c. *Lab Anim Sci* 31(6): 683-687
- 76 Shakibaei M, Schulze-Tanzil G, Mobasher A, Beichler T, Dressler J, Schwab W (2003): Expression of the VEGF receptor-3 in osteoarthritic chondrocytes: stimulation by interleukin-1 β and association with β 1-integrins. *Histochem Cell Biol* 120(3) 235-41

- 77 Shapiro F, Glimcher M (1980): Induction of osteoarthritis in the rabbit knee joint: histological changes following meniscectomy and meniscal lesions. *Clin Orthop* 147: 287-295
- 78 Shweiki D, Itin A, Neufeld G, Gitay-Goren H, Keshet E (1993): Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *J Clin Invest* 91(5): 2235-2243
- 79 Street J, Bao M, de Guzman L, Bunting S, Peale FV, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RAD, Filvaroff EH (2002): Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci* 99(15): 9656-9661
- 80 Studer RK, Levicoff E, Georgescu HJ, Miller L, Jaffurs D, Evans CH (2000): Nitric oxide inhibits chondrocyte response to IFG-I: inhibition of IGF-IR β tyrosine phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol* 279(4): 961-969
- 81 Takahashi K, Goomer RS (1999): The effects of hyaluronan on matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), interleukin-1 β , and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene expression during the development of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 7(2): 182-190
- 82 Telhag H, Lindberg L (1972): A method for inducing osteoarthritic changes in rabbits' knees. *Clin Orthop* 147(86): 214-223
- 83 Van Bladel S, Libert C, Fiers W, et al. (1991): Interleukin-6 enhances the expression of tumour necrosis factor receptors on hepatoma cells and hepatocytes. *Cytokine* 3(2): 149-154
- 84 van den Berg WB(1999): The role of cytokines and growth factors in cartilage destruction in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol* 58(3): 136-141
- 85 Vignon E, Bejui J, Mathieu P, Hartmann JD, Ville G, Evreux JC, Descotes J (1987): Histological cartilage changes in a rabbit model of osteoarthritis. *J Rheumatol* 14: 104-106
- 86 Visco DM, Hill MA, Widmer WR, Johnstone B, Myers SL (1996): Experimental osteoarthritis in dogs: a comparison of the Pond-Nuki and medial arthrotomy methods. *Osteoarthritis Cartilage* 4(1): 9-22

- 87 von der Mark K, Kirsch T, Nerlich A, Kuss A, Weseloh G, Glückert K (1992): Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage; indication of chondrocyte hypertrophy. *Arthr Rheum* 35(7): 806-811
- 88 Westacott CI, Sharif M (1996): Cytokines in Osteoarthritis: Mediators or Markers of Joint Destruction?. *Semin Arthritis Rheum* (1996) 25(4): 254-272
- 89 Westacott CI, Taylor G, Atkins RM (1992): Interleukin 1 α and β production by cells isolated from membrane around aseptically loose total joint replacements. *Ann Rheum Dis* 51(2): 638-642
- 90 Yoshioka M, Coutts RD, Amiel D, Hacker SA (1996): Characterization of a model of osteoarthritis in the rabbit knee. *Osteoarthritis Cartilage* 4(2): 87-98

7 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1	schematische Darstellung der Zytokine, die Einfluss auf den Stoffwechsel des Chondrozyten haben	12
Abbildung 2	Die verschiedenen VEGF-Isoformen entstehen durch alternatives Splicing derselben mRNA (Abbildung nach C. Robinson, The splice variants of VEGF and their receptors (2001))	18
Abbildung 3	intraoperativer Lachmantest, Knie in Normalstellung	28
Abbildung 4	intraoperativer Lachmantest, mit deutlich nachweisbarer vorderer Schublade	28
Abbildung 5	Wundversorgung postoperativ	29
Abbildung 6	Kaninchen nach Operation beider Kniegelenke	29
Abbildung 7	Anzahl der Gelenke mit Ulzerationen des Knorpels in Abhängigkeit der Wochen nach Operation	39
Abbildung 8	Anzahl der Gelenke mit Osteophyten in Abhängigkeit der Wochen nach Operation	40
Abbildung 9	intakter Gelenkknorpel beider Femurkondylen eines nicht operierten Tieres	41
Abbildung 10	deutliche Fibrillationen und Osteophytenbildung beider Femurkondylen (3 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)	41
Abbildung 11	beginnende Knorpeldefekte bis auf den Knochen beider Kondylen und ausgeprägte Osteophytenbildung (6 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)	42
Abbildung 12	Freilegung des subchondralen Knochens und ausgeprägte Osteophytenbildung (12 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)	42
Abbildung 13	Anzahl der Gelenke mit Erguss in Abhängigkeit der Wochen nach Operation	43

Abbildung 14	Vergleich des makroskopischen Arthrosegrades nach Scheinoperation und Kreuzbanddurchtrennung	44
Abbildung 15	Anzahl der Gelenke mit Proteoglykanverlust in Abhängigkeit der Wochen nach Operation	46
Abbildung 16	kein Proteoglykanverlust im Knorpel eines Tieres aus der Kontrollgruppe (6 Wochen nach Scheinoperation)	46
Abbildung 17	geringe Reduktion der Färbungsintensität aufgrund beginnenden Proteoglykanverlustes (3 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)	47
Abbildung 18	mäßige Reduktion der Färbungsintensität aufgrund fortgeschrittenen Proteoglykanverlustes (6 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)	47
Abbildung 19	starke Reduktion der Färbungsintensität aufgrund fast vollständigem Proteoglykanverlustes (12 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)	48
Abbildung 20	Vergleich des histologischen Arthrosegrades nach Scheinoperation und Kreuzbanddurchtrennung	50
Abbildung 21	Korrelation zwischen dem makroskopischen und histologischen Arthrosegrad	50
Abbildung 22	histologisches Knorpelbild eines nicht operierten Kaninchens	51
Abbildung 23	beginnende Zerstörung der intakten Knorpelstruktur (3 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)	51
Abbildung 24	völlige Aufhebung der regelgerechten Knorpelarchitektur mit Rissbildung und Clusterbildung (6 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)	52
Abbildung 25	tiefe Rissbildung und Zerstörung der Knorpeloberfläche (12 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung)	52
Abbildung 26:	vollständiger Verlust des Knorpels bis auf einen schmalen noch verbliebenen Saum	53
Abbildung 27	Kontrolle	54
Abbildung 28	Immunhistochemische Färbung	54
Abbildung 29	Vergleich der VEGF-Expression nach Scheinoperation und Kreuzbanddurchtrennung	55

Abbildung 30	Korrelation zwischen dem histologischen Arthrosegrad und der VEGF-Expression	56
Abbildung 31	Korrelation zwischen dem makroskopischen Arthrosegrad und der VEGF-Expression	56
Abbildung 32	VEGF-Expression 3 Wochen nach Scheinoperation	57
Abbildung 33	VEGF-Expression 3 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung	57
Abbildung 34	VEGF-Expression 6 Wochen nach Scheinoperation	58
Abbildung 35	VEGF-Expression 6 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung	58
Abbildung 36	VEGF-Expression 12 Wochen nach Scheinoperation	59
Abbildung 37	VEGF-Expression 12 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung	59

8 Abkürzungsverzeichnis

BMP	bone morphogenic protein
BSA	bovine serum albumin
CDMP	chondrocyte derived morphogenic proteins
COX	Cyclooxygenase
flk	fetal liver kinase
FLT	fms-like tyrosine kinase
IGF	insuline like growth factor
IL	Interleukin
KDR	kinase domain region
LIF	leukaemia inhibitory factor
MMP	matrix metalloproteinase
mRNA	messenger ribonucleic acid
MT-MMP	membrane-type matrix metalloproteinase
NOS	Stickstoffsynthetase
OA	Osteoarthrose
p	Signifikanzniveau
r	Korrelationskoeffizient
RT-PCR	reverse transcriptase-polymerase chain reaction
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinases
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor necrose factor
TRIS	Tris-Puffer
t-PA	tissue plasminogen activator
VEGF	vascular derived endothelial growth factor
VEGFR	VEGF-Rezeptor

9 Danksagung

Zunächst bedanke ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Susanne Fuchs, die mir die Bearbeitung dieses Themas ermöglichte.

Ferner gilt mein Dank Dr. Carsten O. Tibesku, Dr. Thomas Szuwart sowie Sabine Kupich für ihre hervorragende Betreuung, gute Zusammenarbeit, außergewöhnliche Hilfsbereitschaft und Flexibilität insbesondere während meiner Schwangerschaft.

Bei Johannes Bertram bedanke ich mich für seine Geduld.

10 Lebenslauf

11 Anhang

11.1 Makroskopische Befunde

Tier	Wochen postoperativ	Fibrillationen	Ulzerationen	Osteophyten	Erguss	Kreuzband
1 re	12	keine	keine	keine	kein	erhalten
1 li	12	keine	keine	keine	kein	erhalten
2 re	12	gering	keine	keine	kein	erhalten
2 li	12	keine	keine	keine	kein	erhalten
3 re	12	keine	keine	gering	kein	erhalten
3 li	12	keine	keine	gering	kein	erhalten
4 re	6	mittelgradig	keine	mittelgradig	mittelgradig	durchtrennt
4 li	6	mittelgradig	keine	mittelgradig	gering	durchtrennt
6 re	6	mittelgradig	keine	keine	kein	erhalten
6 li	6	gering	keine	keine	kein	erhalten
7 re	12	ausgeprägt	großflächig	ausgeprägt	ausgeprägt	durchtrennt
7 li	12	mittelgradig	kleinflächig	ausgeprägt	ausgeprägt	durchtrennt
9 re	6	mittelgradig	keine	mittelgradig	mittelgradig	durchtrennt
9 li	6	mittelgradig	kleinflächig	ausgeprägt	mittelgradig	durchtrennt
10 re	12	gering	keine	keine	kein	erhalten
10 li	12	gering	keine	keine	kein	erhalten
11 re	12	ausgeprägt	keine	mittelgradig	ausgeprägt	durchtrennt
11 li	12	ausgeprägt	kleinflächig	mittelgradig	ausgeprägt	durchtrennt
12 re	12	ausgeprägt	großflächig	ausgeprägt	mittelgradig	durchtrennt
12 li	12	ausgeprägt	großflächig	ausgeprägt	mittelgradig	durchtrennt
13 re	6	keine	keine	keine	kein	erhalten
13 li	6	keine	keine	keine	kein	erhalten
14 re	3	keine	keine	gering	kein	erhalten
14 li	3	keine	keine	keine	kein	erhalten
15 re	6	keine	keine	keine	kein	erhalten
15 li	6	keine	keine	keine	kein	erhalten
16 re	3	mittelgradig	keine	mittelgradig	ausgeprägt	durchtrennt
16 li	3	mittelgradig	keine	mittelgradig	ausgeprägt	durchtrennt
17 re	6	gering	keine	mittelgradig	kein	durchtrennt
17 li	6	gering	kleinflächig	mittelgradig	mittelgradig	durchtrennt
18 re	6	ausgeprägt	großflächig	ausgeprägt	mittelgradig	durchtrennt
18 li	6	ausgeprägt	kleinflächig	ausgeprägt	mittelgradig	durchtrennt
19 re	3	mittelgradig	keine	mittelgradig	mittelgradig	durchtrennt
19 li	3	mittelgradig	keine	mittelgradig	mittelgradig	durchtrennt
20 re	3	mittelgradig	kleinflächig	mittelgradig	ausgeprägt	durchtrennt
20 li	3	mittelgradig	großflächig	mittelgradig	ausgeprägt	durchtrennt
21 re	3	keine	keine	keine	kein	erhalten
21 li	3	keine	keine	keine	kein	erhalten
22 re	3	gering	keine	gering	mittelgradig	durchtrennt
22 li	3	gering	keine	gering	mittelgradig	durchtrennt
23 re	3	gering	keine	keine	kein	erhalten
23 li	3	keine	keine	keine	kein	erhalten
24 re	3	keine	keine	keine	kein	erhalten
24 li	3	gering	keine	gering	kein	erhalten
25 re	6	gering	keine	keine	kein	erhalten
25 li	6	gering	keine	keine	kein	erhalten

11.2 Histologische Befunde

Tier	Struktur	Zellen	Färbungsintensität Safranin-O	Integrität Übergangszone	Mankin- Score
1 re	Oberflächen- unregelmäßigkeiten	normal	mäßige Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	4
1 li	normal	diffuse Hyperzellularität	geringe Reduktion	intakt	2
2 re	Oberflächen- unregelmäßigkeiten	normal	mäßige Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	4
2 li	normal	normal	geringe Reduktion	intakt	1
3 re	normal	normal	geringe Reduktion	intakt	1
3 li	normal	normal	geringe Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	2
4 re	Risse bis in die Radiärzone	Cloning	starke Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	10
4 li	Risse bis in die Radiärzone	Hypozellularität	starke Reduktion	intakt	10
6 re	Oberflächen- unregelmäßigkeiten	normal	geringe Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	3
6 li	normal	normal	geringe Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	2
7 re	Risse bis in die Übergangszone	Hypozellularität	starke Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	10
7 li	Oberflächen- unregelmäßigkeiten	normal	starke Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	5
9 re	Oberflächen- unregelmäßigkeiten	normal	geringe Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	3
9 li	Risse bis in die verkalkte Zone	diffuse Hyperzellularität	starke Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	10
10 re	normal	normal	geringe Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	2
10 li	normal	normal	geringe Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	2
11 re	Risse bis in die verkalkte Zone	Cloning	starke Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	11
11 li	Risse bis in die Radiärzone	Hypozellularität	starke Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	11
12 re	Pannus u. Oberfl.- unregelmäßigkeiten	Cloning	starke Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	8
12 li	komplette Desorganisation	Hypozellularität	keine Färbung nachweisbar	von Blutgefäßen durchzogen	14
13 re	normal	normal	geringe Reduktion	intakt	1
13 li	Oberflächen- unregelmäßigkeiten	normal	normal	von Blutgefäßen durchzogen	2

Tier	Struktur	Zellen	Färbungsintensität Safranin-O	Integrität Übergangszone	Mankin- Score
14 re	normal	normal	starke Reduktion	intakt	3
14 li	Oberflächen- unregelmäßigkeiten	normal	geringe Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	3
15 re	normal	normal	normal	intakt	0
15 li	normal	normal	normal	intakt	0
16 re	Risse bis in die Übergangszone	Hypozellularität	starke Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	10
16 li	Risse bis in die Radiärzone	Cloning	mäßige Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	9
17 re	Oberflächen- unregelmäßigkeiten	diffuse Hyperzellularität	geringe Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	4
17 li	Risse bis in die Übergangszone	Cloning	mäßige Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	8
18 re	Risse bis in die Radiärzone	Cloning	starke Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	10
18 li	Risse bis in die Übergangszone	diffuse Hyperzellularität	keine Färbung nachweisbar	von Blutgefäßen durchzogen	9
19 re	Oberflächen- unregelmäßigkeiten	Hypozellularität	starke Reduktion	intakt	7
19 li	Risse bis in die Übergangszone	normal	starke Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	7
20 re	Oberflächen- unregelmäßigkeiten	Hypozellularität	keine Färbung nachweisbar	von Blutgefäßen durchzogen	9
20 li	Risse bis in die Übergangszone	Hypozellularität	keine Färbung nachweisbar	von Blutgefäßen durchzogen	11
21 re	normal	diffuse Hyperzellularität	geringe Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	3
21 li	Oberflächen- unregelmäßigkeiten	diffuse Hyperzellularität	geringe Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	4
22 re	normal	normal	mäßige Reduktion	intakt	2
22 li	Oberflächen- unregelmäßigkeiten	normal	geringe Reduktion	intakt	2
23 re	Oberflächen- unregelmäßigkeiten	diffuse Hyperzellularität	geringe Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	4
23 li	Oberflächen- unregelmäßigkeiten	normal	mäßige Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	5
24 re	normal	diffuse Hyperzellularität	mäßige Reduktion	intakt	3
24 li	Oberflächen- unregelmäßigkeiten	diffuse Hyperzellularität	geringe Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	4
25 re	normal	normal	normal	intakt	0
25 li	normal	normal	normal	intakt	0

Tier	Struktur	Zellen	Färbungsintensität Safranin-O	Integrität Übergangszone	Mankin- Score
N1 re	normal	normal	normal	von Blutgefäßen durchzogen	1
N1 li	normal	normal	geringe Reduktion	intakt	1
N2 re	normal	normal	normal	intakt	0
N2 li	normal	normal	normal	Intakt	0
N3 re	normal	normal	mäßige Reduktion	intakt	2
N3 li	normal	normal	mäßige Reduktion	intakt	2
N4 re	normal	normal	starke Reduktion	von Blutgefäßen durchzogen	4
N4 li	normal	diffuse Hyperzellularität	starke Reduktion	intakt	4

11.3 VEGF-Expression

3 Wochen nach Scheinoperation

Gewebeprobe	VEGF in %	VEGF-Gesamtexpression in %
R 14 re a	17,49	20,9
b	26,99	
c	21,8	
R 14 li a	12,52	14,24
b	12,12	
c	21,92	
R 21 re a	12,29	21,47
b	13,65	
c	6,34	
R 21 li a	22,49	17,9
b	22,75	
c	12,13	
R 23 re a	8,08	15,17
b	21,08	
c	21,8	
R 23 li a	13,73	16,65
b	14,36	
c	22,99	
R 24 re a	6,74	6,47
b	7,14	
c	5,65	
R 24 li a	17,74	17
b	13,54	
c	22,41	

3 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung

Gewebeprobe	VEGF in %	VEGF-Gesamtexpression in %
R 16 re a	19,48	20,99
b	16,63	
c	28,66	
R 16 li a	31,79	26,97
b	18,42	
c	33,51	
R 19 re a	25,32	19,59
b	16,5	
c	18,66	
R 19 li a	20,61	17,76
b	13,94	
c	19,02	
R 20 re a	16,97	15,25
b	14,65	
c	14,49	
R 20 li a	19,07	19,88
b	18,24	
c	23	

Gewebeprobe	VEGF in %	VEGF-Gesamtexpression in %
R 22 re a	15,34	8,59
b	4,89	
c	9,34	
R 22 li a	10,38	12,13
b	9,98	
c	17,28	

6 Wochen nach Scheinoperation

Gewebeprobe	VEGF in %	VEGF-Gesamtexpression in %
R 6 re a	16,27	18,19
b	19,7	
c	18,47	
R 6 li a	11,78	14,54
b	16,79	
c	15,56	
R 13 re a	8,33	4,64
b	3,58	
c	4,54	
R 13 li a	8,13	9,38
b	12,63	
c	14,06	
R 15 re a	4,21	5,12
b	5,95	
c	5,2	
R 15 li a	8,29	5,93
b	3,7	
c	5,19	
R 25 re a	19,73	15,15
b	12,28	
c	14,47	
R 25 li a	24,38	19,05
b	14,78	
c	20,4	

6 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung

Gewebeprobe	VEGF in %	VEGF-Gesamtexpression in %
R 4 re a	25	29,58
b	34,99	
c	30,18	
R 4 li a	15,41	19,18
b	24,69	
c	18,47	
R 9 re a	11,39	13,49
b	11,93	
c	17,23	
R 9 li a	18,55	18,4
b	19,17	
c	17,76	

Gewebeprobe	VEGF in %	VEGF-Gesamtexpression in %
R 17 re a	21,99	19,58
b	17,66	
c	18,91	
R 17 li a	17,28	19,38
b	17,4	
c	25,86	
R 18 re a	23,02	19,09
b	18,51	
c	15,55	
R 18 li a	19,37	16,86
b	14,55	
c	17,05	

12 Wochen nach Scheinoperation

Gewebeprobe	VEGF in %	VEGF-Gesamtexpression in %
R 1 re a	19,29	18,53
b	17,84	
c	18,67	
R 1 li a	12,05	12,01
b	11,23	
c	13,04	
R 2 re a	17,99	11,03
b	7,59	
c	9,61	
R 2 li a	8,6	11,13
b	15,2	
c	11,81	
R 3 re a	14,92	13,37
b	12,3	
c	12,74	
R 3 li a	13,6	8,07
b	8,51	
c	5,59	
R 10 re a	11,9	8,62
b	4,79	
c	12,9	
R 10 li a	8,62	9,86
b	14,07	
c	8,17	

12 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung

Gewebeprobe	VEGF in %	VEGF-Gesamtexpression in %
R 7 re a	23,2	20,9
b	16,18	
c	27,07	
R 7 li a	12,78	15,45
b	16,09	
c	17,59	
R 11 re a	24,5	23,62
b	20,73	
c	25,54	
R 11 li a	39,84	20,97
b	16,33	
c	15,6	
R 12 re a	14,59	16,32
b	17,25	
c	17,3	
R 12 li a	31,07	30,33
b	32,3	
c	27,82	

Nicht operierte Tiere

Gewebeprobe	VEGF in %	VEGF-Gesamtexpression in %
N1 re a	22,54	14,36
b	10,2	
c	14,57	
N1 li a	12,22	10,2
b	7,9	
c	12,15	
N2 re a	12,81	12,4
b	11,36	
c	13,95	
N2 li a	3,35	8,2
b	8,52	
c	16,67	
N3 re a	15,16	13,1
b	11,61	
c	14,56	
N3 li a	7,55	8,92
b	10,56	
c	8,65	
N4 re a	12,31	13,24
b	11,59	
c	16,37	
N4 li a	18,39	15,14
b	9,12	
c	14,65	

11.4 Ergebnisse – Mittelwerte

Versuchs- zeitraum	Schein- operation	Kreuzband- durchtrennung	t-Test
	[MW ± StAw]	[MW ± StAw]	P
0 Wochen	11,95 StAw = 2,55 n=8		
3 Wochen	16,225 StAw = 4,6777 n=8	17,645 StAw = 5,6705 n=8	0,594
6 Wochen	11,5 StAw = 5,9475 n=8	19,445 StAw = 4,5697 n=8	0,01
12 Wochen	11,5775 StAw = 3,3001 n=8	21,265 StAw = 5,4075 n=6	0,05

MW = Mittelwert

StAw = Standardabweichung

11.5 Ergebnisse – Korrelationskoeffizient nach Spearman

Mankin-Score zu Makroskopischen Ergebnissen: $r = 0,750$
 $p < 0,01$

VEGF-Expression zu Mankin-Score: $r = 0,767$
 $p < 0,01$

VEGF-Expression zu Makroskopischen Ergebnissen: $r = 0,518$
 $p = 0,02$

VEGF-Expression (Kreuzband durchtrennt) zu Zeit: $r = 0,257$
 $p = 0,248$

VEGF-Expression zu Osteophytenbildung $r = 0,651$
 $p < 0,01$

ENTWURF
Dateiname: N:\T_VERS\GENNEU
Erstellt am 24.07.00
Bearbeiter: moel



Bezirksregierung Münster

1.

Bezirksregierung Münster . 48128 Münster

Gegen Empfangsbekanntnis

Herrn
Prof. Dr. W. Winkelmann
Klinik und Poliklinik für
Allgemeine Orthopädie der
Westf. Wilhelms-Universität Münster
Albert-Schweitzer-Str. 33

Ab 25. JULI 2000

Dienstgebäude
Domplatz 1-3
Telefon: (0251) 411-0
Durchwahl: 2110
Zimmer: 431
Frau Möllers
Aktenzeichen
23.0835.1.0 (G 49/2000)

25. Juli 2000

48129 Münster

Betr.: Tierschutz;
hier: Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Bezug: Ihr Antrag vom 29.05.2000, hier eingegangen
am 06.06.2000

G e n e h m i g u n g s b e s c h e i d :

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Winkelmann,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I. S. 1105) wird Ihnen die Genehmigung zur Durchführung nachstehenden Versuchsvorhabens erteilt:

Untersuchung der Konzentration des Hyaluronsäurerezeptors CD44 in der Gelenkflüssigkeit bei experimentell induzierter Arthrose am Beispiel des Kniegelenkes des Kaninchens.

Leiter des Versuchsvorhabens und seine Stellvertreterin sind:

Herr
Prof. Dr. med. W. Winkelmann
Klinik und Poliklinik
für Allgemeine Orthopädie
der WWU Münster
Albert-Schweitzer-Str. 33

Frau
Dr. med. Susanne Fuchs
Klinik und Poliklinik
für Allgemeine Orthopädie
der WWU Münster
Albert-Schweitzer-Str. 33

48129 Münster

48129 Münster.

Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300

e-mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de ● X-400: C=de, A=dbp, P=dvs-nrw, O=bezreg-muenster, S=poststelle ● Telefax (0251) 411-2525

Konten der Regierungshauptkasse Münster:

Landeszentralbank Niederlassung Münster BLZ: 400 000 00 Konto: 40 001 520

Westdeutsche Landesbank Girozentrale Münster BLZ: 400 500 00 Konto: 61 820

Öffentliche Verkehrsmittel - Buslinien 1 . 5 . 6 . 17 bis Haltestelle Prinzipalmarkt und 2 . 10 . 11 . 14 . 21 . 64 bis Domplatz

„Dienstkopie Bezirksregierung Münster“

Diese Genehmigung gilt bis zum **28. 02. 2002.**

Zur Durchführung des Versuchsvorhabens dürfen folgende Tiere verwendet werden:

24 Neuseeland-Kaninchen.

Auflagen:

Mit dem Versuchsvorhaben darf erst nach Vorliegen dieser Genehmigung begonnen werden.

Sofern der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter wechselt, ist mir dieser Wechsel unverzüglich anzuzeigen.

Diese Genehmigung wird zurückgenommen, wenn bei der Erteilung die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht gegeben waren.

Sie wird widerrufen, wenn die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb einer von mir zu bestimmenden Frist abgeholfen wird; sie kann widerrufen werden, wenn ihre Bedingungen und Auflagen nicht erfüllt werden oder den Vorschriften des § 9 Abs. 2 TierSchG wiederholt oder grob zuwidergehandelt worden ist.

Ein Antrag auf Verlängerung der Genehmigung ist rechtzeitig vor Ablauf der Frist bei mir zu stellen.

Da das Versuchsvorhaben überwiegend im öffentlichen Interesse erfolgt, wird von der Erhebung einer Verwaltungsgebühr Abstand genommen.

Rechtsbehelfsbelehrung:

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist bei mir unter der oben genannten Anschrift schriftlich oder zur Niederschrift einzureichen.

Sollte die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden, so würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

Ich bitte um umgehende Rückgabe des beiliegenden Empfangsbekennnisses.

Mit freundlichen Grüßen
I. A.


Dr. Wissing



DER
OBERBÜRGERMEISTER



VETERINÄR- UND
LEBENSMITTEL-
ÜBERWACHUNGSAMT

Postanschrift: Stadt Münster • 48127 Münster

Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie
z.H. Herrn Prof. Dr. W. Winkelmann
Albert-Schweitzer-Str. 33

48149 Münster

Scheimenstiege 1
Auskunft erteilt:
Frau Heumann
Zimmer: 106
Telefon: 02534/971 - 301
Telefax: 02534/971 - 399
E-Mail: Amt_39@stadt-
muenster.de
Sprechzeiten:
nach Vereinbarung

Datum und Zeichen Ihres Schreibens:
29.05.2000 an die Bezirksregierung
hier eingegangen am 19.06.2000

Mein Zeichen (Bitte angeben):
39/401 a)

Münster,
11.07.2000

**Tierschutzgesetz;
Tierversuch G 49/2000**

Versuchsleiter und Antragsteller: Prof. Dr. W. Winkelmann	Stellvertreterin: Dr. Susanne Fuchs
--	--

Sehr geehrter Herr Professor Winkelmann,

aufgrund § 11 Tierschutzgesetz erteile ich Ihnen die Erlaubnis zur Haltung von
24 Neuseeland-Kaninchen.

Folgende Auflagen sind einzuhalten:

1. Für die Pflege und Betreuung sind die Pfleger des Tierstalles zuständig.
2. Die medizinische Versorgung hat durch Professor Richter von der ZTE zu erfolgen.
3. Die Käfige sind mit der Nummer der Versuchsgenehmigung zu kennzeichnen.
4. Über die Tierversuche, die bezogenen Tiere und ihren Verbleib sind Aufzeichnungen zu machen. Diese sind drei Jahre lang nach Abschluss des Versuchsvorhabens aufzubewahren und mir auf Verlangen zur Einsichtnahme vorzulegen.
5. Änderungen und Erweiterungen im Personalbereich, bei Tierart- und zahl sowie der Unterbringung sind mir umgehend mitzuteilen.

Bitte beachten Sie, dass der Versuch erst begonnen werden kann, wenn Ihnen die Genehmigung der Bezirksregierung Münster vorliegt. Diese Erlaubnis gilt für die Laufzeit des genehmigten Versuches.

Mit freundlichen Grüßen

i.A.

Dr. Bolle
Städt. Oberveterinärarzt

Konten der Stadtkasse

Sparkasse Münster	Kto.-Nr. 752	(BLZ 400 501 50)	Commerzbank Münster	Kto.-Nr. 393 210 0/00	(BLZ 400 400 28)
Landeszentralbank Münster	Kto.-Nr. 40 001 700	(BLZ 400 000 00)	Deutsche Bank Münster	Kto.-Nr. 0470 005	(BLZ 400 700 80)
Postbank Dortmund	Kto.-Nr. 21 1 36-461	(BLZ 440 100 46)	Dresdner Bank Münster	Kto.-Nr. 606 465 600	(BLZ 400 800 40)
Bank für Gemeinwirtschaft	Kto.-Nr. 1 010 305 100	(BLZ 400 101 11)	Volksbank Münster eG	Kto.-Nr. 4 200 800	(BLZ 401 600 50)
Bankhaus Lampe Münster	Kto.-Nr. 305 002	(BLZ 480 201 51)	Westdeutsche Landesbank Münster	Kto.-Nr. 61 226	(BLZ 400 500 00)

Zentrale Verbindungen

⇒ Hauptvermittlung	(0251) 492-0
Telefax	(0251) 492-7700
Datex-J	*0251492#
E-Mail	Stadtverwaltung@stadt-muenster.de

DER
OBERBÜRGERMEISTER



Postanschrift: Stadt Münster • 48127 Münster

Frau
PD Dr. Susanne Fuchs
Klinik und Poliklinik für
Allgemeine Orthopädie
Albert-Schweitzer-Str. 33
48149 Münster

VETERINÄR- UND
LEBENSMITTEL-
ÜBERWACHUNGSAMT

Schelmenstiege 1

Auskunft erteilt:
Frau Heumann
Zimmer: 106
Telefon: 02534/971 - 301
Telefax: 02535/971 - 399
E-Mail:
Amt39@stadt-muenster.de
Sprechzeiten:
nach Vereinbarung

Datum und Zeichen Ihres Schreibens:
23.07.2001 an die Bezirksregierung
hier eingegangen am 03.09.2001

Mein Zeichen (Bitte angeben):
39/401 a)

Münster,
06.09.2001

Tierschutzgesetz;

Tierversuch: A 58/2001	
Versuchsleiterin: Frau Dr. Susanne Fuchs	Stellvertreter und Antragsteller: Dr. Carsten O. Tibesku

Sehr geehrte Frau Dr. Fuchs,

aufgrund § 11 Tierschutzgesetz in der z.Z. gültigen Fassung erteile ich Ihnen die Erlaubnis zur
Haltung von

4 Kaninchen.

Folgende Auflagen sind einzuhalten:

1. Für die Pflege und Betreuung sind die Tierpfleger Ihres Institutes zuständig.
2. Die medizinische Versorgung hat durch Herrn Dr. Lücke, Leiter der ZTE, zu erfolgen.
3. Die Käfige sind mit der Nummer der Versuchsgenehmigung zu kennzeichnen.
4. Über die Tierversuche, die bezogenen Tiere und ihren Verbleib sind Aufzeichnungen zu machen. Diese sind drei Jahre lang nach Abschluss des Versuchsvorhabens aufzubewahren und mir auf Verlangen zur Einsichtnahme vorzulegen.
5. Änderung und Erweiterung im Personalbereich, bei der Tierart und -zahl sowie der Unterbringung sind umgehend dem Veterinäramt der Stadt Münster mitzuteilen.

Die Erlaubnis gilt für die Laufzeit des angezeigten Versuches.

Mit freundlichen Grüßen

i.A.

Dr. Otto
Städt. Veterinärdirektor

Konten der Stadtkasse

Stadtparkkasse Münster Kto.-Nr. 752
Landeszentralbank Münster Kto.-Nr. 40 001 700
Postbank Dortmund Kto.-Nr. 21 1 36-461
Bank für Gemeinwirtschaft Kto.-Nr. 1 010 305 100
Bankhaus Lampe Münster Kto.-Nr. 306 002

(BLZ 400 501 50) Commerzbank Münster
(BLZ 400 000 00) Deutsche Bank Münster
(BLZ 440 100 46) Dresdner Bank Münster
(BLZ 400 101 11) Volksbank Münster eG
(BLZ 480 201 51) Westdeutsche Landesbank Münster

Kto.-Nr. 393 210 0100 (BLZ 400 400 28)
Kto.-Nr. 0470 005 (BLZ 400 700 80)
Kto.-Nr. 606 465 600 (BLZ 400 800 40)
Kto.-Nr. 4 200 800 (BLZ 401 600 50)
Kto.-Nr. 61 226 (BLZ 400 500 00)

Zentrale Verbindungen

■ Hauptvermittlung (0251) 492-0
Telefax (0251) 492-7700
Datex-J *0251492#
E-Mail
Stadtverwaltung@stadt-muenster.de



Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster . 48128 Münster

Frau
PD Dr. med. Susanne Fuchs
Klinik und Poliklinik für
Allgemeine Orthopädie des
Universitätsklinikums Münster
Albert-Schweitzer-Str. 33

48149 Münster

Dienstgebäude
Domplatz 1-3
Telefon: (0251) 411-0
Durchwahl: 2110
Zimmer: 431
Frau Möllers
Aktenzeichen
50.0835.2.0 (A 58/2001)

28. August 2001

**Anzeige von Versuchsvorhaben gemäß § 8 a Abs. 1 und 2
Tierschutzgesetz (TierSchG);**

**Versuchsvorhaben: "Tötung von vier weißen Neuseelandkaninchen
zur Entnahme beider Kniegelenke"**

Ihre Anzeige vom 23.07.2001 - hier eingegangen am 30.07.2001

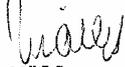
Sehr geehrte Frau Dr. Fuchs,

Ihre o.a. Anzeige wird hiermit bestätigt.
Einer Genehmigung für das Versuchsvorhaben bedarf es nicht.

Ich weise jedoch darauf hin, daß Sie gemäß § 8b Abs. 5 TierSchG
den für Sie zuständigen Tierschutzbeauftragten zu unterrichten
haben.

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag


Möllers