

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

# CD44-Expression bei experimentell induzierter Arthrose im Kaninchenmodell

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Stephanie Anne-Marie Ocken

aus Koblenz

2003

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

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Susanne Fuchs

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Michael J. Raschke

Tag der mündlichen Prüfung: 19.04.2004

Meiner Familie in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

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

### **Zusammenfassung**

CD44-Expression bei experimentell induzierter Arthrose im Kaninchen­gelenk

Stephanie Anne-Marie Ocken

**Einleitung:** Vorangegangene Studien zeigen eine Beteiligung des CD44-Rezeptors bei der Aufrechterhaltung der Homöostase des Knorpelstoffwechsels und der Verankerung der extrazellulären Matrix und legen eine Beteiligung dieses Rezeptors in der Pathogenese der Arthrose nahe. Es gibt jedoch bis jetzt nur wenige Informationen über die CD44-Expression in den Frühphasen der Arthroseentstehung.

**Ziel** der vorliegenden Studie war die Bestimmung der Expression der Isoformen v5 und v6 des CD44-Rezeptors im Laufe der Entwicklung einer experimentell induzierten Arthrose im Kaninchen­gelenk.

**Methode:** 12 ausgewachsenen Neuseelandkaninchen wurde das vordere Kreuzband reseziert, 12 weitere erhielten lediglich eine Eröffnung und Spülung des Gelenkes (Kontrollgruppe). Aus jeder Gruppe wurden jeweils vier Tiere nach 3, 6 und 12 Wochen getötet. 4 weiteren Tieren wurden ohne vorausgehende Operation die Kniegelenke entnommen. Die entnommenen Gelenke wurden makroskopisch und histologisch auf arthrotische Veränderungen des Knorpels untersucht. Es erfolgte eine immunhistochemische Färbung von CD44v5 und -v6 (Tierversuchsgenehmigung durch die Bezirksregierung Münster vom 25.07.00; Az 23.0835.1.0.(G49/2000)).

**Ergebnis:** Nach Kreuzbanddurchtrennung zeigte sich in der Versuchsgruppe eine sowohl makroskopisch als auch histologisch schnell progrediente Arthroseentstehung. Immunhistochemisch konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe ein Anstieg der CD44v5- und v6-Expression in der Versuchsgruppe nachgewiesen werden. Es ergab sich eine signifikante Korrelation der Expression von v6 mit dem histologischen bzw. makroskopischen Arthrosegrad ( $r = 0,271$  bzw.  $0,624$ ,  $p < 0,05$ ). Für v5 ergab sich eine signifikante Korrelation mit dem histologischen Arthrosegrad ( $r = 0,622$ ;  $p < 0,05$ ). Die am stärksten ausgeprägte Expression beider Isoformen zeigte sich in Regionen mit starkem Proteoglykanverlust.

**Schlussfolgerung:** Diese Studie zeigt eine Zunahme der Expression der Isoformen CD44-v5 und -v6 auf Chondrozyten im Laufe der Entstehung einer Arthrose, die eng mit den morphologischen Veränderungen des Knorpels assoziiert ist. Dies spricht für eine Beteiligung dieser CD44-Isoformen an der Pathogenese der Arthrose.

<b>Einleitung</b>	<b>8</b>
1.1 Der hyaline Gelenkknorpel	8
1.2 Arthrose	9
1.2.1 Epidemiologie und sozioökonomische Bedeutung	9
1.2.2 Ätiologie	10
1.2.3 Pathogenese	10
1.2.4 Therapie	14
1.3 CD 44	15
1.3.1 CD 44 in der Tumorforschung	18
1.3.2 CD 44 in der Arthroseforschung	20
1.4 Fragestellung und Zielsetzung	21
<b>2 Material und Methode</b>	<b>23</b>
2.1 Versuchsaufbau	23
2.2 Operationsmethode	23
2.3 Probenentnahme und Aufarbeitung der Proben	25
2.3.1 Probenentnahme	25
2.3.2 Makroskopische Beurteilung	25
2.3.3 Gewinnung der histologischen Schnitte	26
2.3.4 Färbeverfahren	27
2.3.5 Histologische Beurteilung	28
2.3.6 Auszählung von Zellen mittels Image Pro Plus	29

2.4	Statistische Auswertung	30
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>31</b>
3.1	Knorpelschäden	31
3.2	Osteophyten	32
3.3	Ergussbildung	33
3.4	Makroskopischer Arthrosegrad	34
3.5	Proteoglykanverlust	37
3.6	Histologischer Arthrosegrad	40
3.7	Immunhistochemische Färbung CD44v5 und v6	44
3.7.1	Kontrollen	44
3.7.2	CD44-v5 Rezeptornachweis	45
3.7.3	CD44-v6 Rezeptornachweis	49
3.8	Regionale CD44v5 und v6 Expression	51
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>53</b>
4.1	Diskussion der Methodik	53
4.1.1	Tiermodellauswahl	53
4.1.2	Probenentnahme	54
4.2	Diskussion der Ergebnisse	55
4.2.1	Arthroseentstehung nach Kreuzbanddurchtrennung	55
4.2.2	CD44-v5 und v6	56
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>69</b>

<b>7</b>	<b>Danksagung</b>	<b>72</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>73</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>I</b>
9.1	Makroskopische Befunde	I
9.2	Histologische Befunde	II
9.3	CD44v5-Expression	IV
9.4	CD44v6-Expression	VII
9.5	Genehmigung des Tierversuch	X

# Einleitung

## 1.1 Der hyaline Gelenknorpel

Formen des Knorpelgewebes sind hyaliner Knorpel, elastischer Knorpel und Faserknorpel. Die häufigste Form im menschlichen Körper ist der hyaline Knorpel. Der elastische Knorpel unterscheidet sich von ihm durch den Besitz elastischer Fasern, der Faserknorpel durch einen erhöhten Anteil von Kollagenfasern. Knorpel dient als Gelenknorpel und Zwischenwirbelscheibe mechanischen Aufgaben, als Stützgewebe zum Beispiel in Trachea oder Ohr und während des Längenwachstums in der Epiphysenfuge als Vorstufe des Knochens.

Der Gelenknorpel überzieht als wenige Millimeter dicke Schicht die Oberflächen der ans Gelenk grenzenden Knochen. Er ist gefäß- und nervenlos. Während junger Knorpel in den tieferen Zonen seine Nährstoffe auch von den Markgefäßen des darunterliegenden Knochens erhalten kann, ist der ausgereifte Gelenknorpel nach Ausbildung der Verkalkungszone von diesen abgeschnitten, so dass seine Ernährung ausschließlich durch Diffusion vom Gelenkspalt erfolgt [42].

Der menschliche Gelenknorpel besteht im Vergleich zu anderen Geweben aus einer relativ geringen Zahl von Zellen, den Chondrozyten, die in einer ausgeprägten extrazellulären Matrix eingebettet sind. Im menschlichen Femurknorpel des Kniegelenks sind beispielsweise nur etwa 10.000 Zellen/mm<sup>3</sup> vorhanden. Die Knorpelzellen liegen einzeln oder in Gruppen von meist 2-8 Zellen, den so genannten Clustern. Die Knorpelmatrix bildet rund um jede einzelne Zelle oder jede Zellgruppe ein Territorium, das unmittelbar als zu ihr gehörig erscheint. Chondrozyten und das sie umgebende Territorium bilden eine funktionelle Einheit, das Chondron, welches Umsatz und Wasseraustausch der extrazellulären Matrix reguliert [74].

Die extrazelluläre Matrix des hyalinen Knorpelgewebes besteht zu 20-30 % aus Proteoglykanen, zu ca. 10 % aus Mineralstoffen und zu 60-70 % aus Wasser. An die Kernproteine der Proteoglykane sind fast ausschließlich Chondroitin- und Keratansulfate gebunden. Wichtigstes Proteoglykan des Knorpels ist Aggrekan. Eine weitere Komponente der extrazellulären Matrix ist die Hyaluronsäure. Obwohl sie in geringeren Konzentrationen als Aggrekan vorkommt, spielt sie eine wichtige Rolle in der Organisation der extrazellulären Matrix, indem sie Aggrekan bindet. Häufig sind mehr als 50 Aggrekanmonomere an ein Hyaluronsäuremolekül gebunden, die dann



Makromoleküle von  $10^7$  bis  $10^8$  Dalton Molekulargewicht bilden. Aufgrund ihrer sehr starken Fähigkeit Wasser zu binden sind diese Proteoglykan-Aggregate für den hohen Gewebsturgor und somit für die Permeabilität und Elastizität des Knorpels verantwortlich. Da Proteoglykanmoleküle bis auf 20 % ihres Volumens komprimiert werden können, sorgt der bei allen Körperbewegungen auftretende Wechsel von Druck und Entspannung für eine ständige Flüssigkeitsbewegung.

Zwischen den Proteoglykanen liegen, an diese elektrostatisch gebunden, Kollagenfibrillen vom Typ II und Typ V. Sie verlaufen im Knorpelinneren senkrecht zur Oberfläche und biegen gegen die Peripherie in oberflächenparallele Richtung ab [10]. Die aggregatreiche Matrix ist unter anderem über die Interaktion zwischen Hyaluronsäure und ihrem Rezeptor (CD44) an der Oberfläche der Chondrozyten verankert [38].

## **1.2 Arthrose**

Die Arthrosis deformans (Synonyme: Arthrose, Osteoarthrose) ist eine primär degenerative Erkrankung des Gelenkknorpels, die in der Regel mit Umbauprozessen am Knochen und reaktiven Veränderungen des Gelenkkapselgewebe einhergeht. Sie führt also nicht nur zum Abbau und letztendlich zum Verlust des Gelenkknorpels, sondern zusätzlich zu pathologischen Veränderungen am subchondralen Knochen, zur Bildung von Osteophyten und zu entzündlichen Veränderungen der Synovialmembran. Auch der Kapsel- und Bandapparat und die periartikuläre Muskulatur sind beteiligt [21].

### **1.2.1 Epidemiologie und sozioökonomische Bedeutung**

Die Arthrose ist die häufigste Erkrankung des Bewegungsapparates, wobei vornehmlich das Kniegelenk, das Hüftgelenk, die Wirbelsäule und das Schultergelenk betroffen sind. Mit steigender Lebenserwartung in den Zivilisationsländern, aber auch durch Veränderung des Freizeitverhaltens der Bevölkerung erlangt dieses Krankheitsbild zunehmend medizinische Relevanz. Gemäß Schätzungen leben in Deutschland 8-10 Millionen Menschen mit einer Arthrose. Von ihnen sind wiederum etwa 25 % symptomatisch und 5 % befinden sich dauerhaft in ärztlicher Behandlung.

Die volkswirtschaftlichen Kosten sind enorm: 37 Millionen Krankheitstage und circa 4,5 Milliarden Euro Kosten jährlich sind durch diese Erkrankung bedingt [20].

### **1.2.2 Ätiologie**

Grundsätzlich unterscheidet man primäre und sekundäre Arthrosen. Die Ursachen der primären Arthrose sind immer noch weitestgehend unbekannt. Allerdings besteht die Hypothese einer genetischen Prädisposition, die durch biomechanische, geschlechts- und altersabhängige sowie endokrinologische Faktoren zum Krankheitsbild der Arthrose führt. Die sekundäre Arthrose wird durch eine Reihe bekannter Faktoren ausgelöst. Dazu gehören posttraumatische Veränderungen wie intraartikuläre Frakturen, Knorpelkontusionen, Bandrupturen oder Meniskusschäden, mechanische Faktoren wie zum Beispiel Beinachsenfehlstellungen und Übergewicht und gelenkspezifische Erkrankungen wie Hüftkopfnekrosen. Diese Einteilung in primäre und sekundäre Arthrosen wird jedoch zunehmend von Autoren in Frage gestellt, die die ätiologischen Faktoren in vielen Fällen für zu komplex und vielfältig halten, um eine so klare Unterteilung zu rechtfertigen. Zudem ist auch die Ätiologie der sekundären Arthrose nicht vollständig verstanden [21]. Unabhängig von der Ätiologie führt jede Form der Arthrose im Endstadium zum gleichen klinischen und pathologischen Bild, das zu einem strukturellen und funktionellen Versagen des synovialen Gelenkes führt.

### **1.2.3 Pathogenese**

Die Knorpeldegeneration im Rahmen einer Arthrose ist in zwei Phasen unterteilbar; eine biosynthetische Phase, in der die Chondrozyten versuchen, die geschädigte extrazelluläre Matrix zu reparieren und eine degenerative Phase, die durch enzymatischen Abbau der extrazellulären Matrix, gehemmte Matrixsynthese und damit fortschreitende Knorpelzerstörung gekennzeichnet ist [75]. In gesundem Knorpel besteht eine genaue Regulation des Matrixumsatzes, ein Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau. Bei der Arthrose ist dieses Gleichgewicht gestört, wobei sowohl Abbau als auch Synthese erhöht sind [59].

Die genauen Vorgänge der Pathogenese der Arthrose sind noch unklar, es werden jedoch im Folgenden die Faktoren aufgezählt, die nach heutiger Kenntnis an der Degradation von Knorpel und damit an der Entstehung von Arthrose beteiligt sind.

Interleukin-1 (IL-1), ein Entzündungsmediator, unterdrückt die Synthese des im hyalinen Knorpel vorkommenden Kollagens Typ II und verstärkt die Synthese von Kollagen Typ I, eines für Fibroblasten typischen Kollagens. Es induziert die Produktion von Metalloproteinasen, die im Matrixabbau eine Rolle spielen, und unterdrückt die Neusynthese von Proteoglykanen in den Chondrozyten. Außerdem hemmt IL-1 die Proliferation von Chondrozyten, induziert die Produktion von Stickoxid (NO) in den Chondrozyten und bewirkt eine vermehrte Apoptose der Knorpelzellen. Es wird hauptsächlich von Knorpelzellen und aktivierten Makrophagen gebildet [7]. IL-1 ist im Serum und in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Arthritiden unterschiedlicher Genese gemessen worden. Biologisch aktives IL-1 ist bei verschiedenen seropositiven und seronegativen Arthritiden gefunden worden und die Plasmaspiegel von IL-1 $\beta$  korrelieren gut mit dem klinischen Befund bei Patienten mit rheumatoider Arthritis. In einer Studie über IL-1-produzierende Zellen war der Anteil der IL-1-produzierenden Makrophagen in der Synovia von Patienten mit Osteoarthrose signifikant höher als in Proben aus gesunden Knien. Zusätzlich zeigte eine Studie, dass die Gabe von Antikörpern gegen IL-1 die Knorpelzerstörung bei experimentell induzierter Arthrose bei Mäusen stark reduzieren kann [36]. Die erhöhte Expression des Typ I-Rezeptors für IL-1 auf arthrotischen Chondrozyten ist ein weiterer Faktor in der Pathogenese der Arthrose, da die IL-1-Konzentration für eine halbmaximale Stimulation von Metalloproteinasen damit 3-4-mal geringer ist als in gesundem Gewebe. Schon eine Bindung von IL-1 an 1 % der Rezeptoren löst eine Produktion kataboler Enzymen in arthrotischen Chondrozyten aus. In gesundem Gewebe müssen 4 % der Rezeptoren besetzt sein [75].

Der Tumornekrose-Faktor (TNF) gehört auch zur Gruppe der katabolen Zytokine. Sein knorpelzerstörendes Potential ist jedoch zehnmal kleiner als das von IL-1 und die Hinweise für seine Produktion und Präsenz im arthrotischen Gelenk sind sehr umstritten. Er wurde nur selten und in kleinen Mengen in der Synovia von Patienten mit Osteoarthrose nachgewiesen [75]. In Proben von Patienten mit rheumatoider Arthritis war er allerdings in signifikanter Menge messbar. Wie IL-1 erhöht er die Synthese von Metalloproteinasen. Im Gegensatz zu Anti-IL-1-Antikörpern oder dem IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1ra), die die Knorpeldestruktion in experimentellen Modellen

der Arthrose stark reduzieren können, wirken Anti-TNF-Antikörper hauptsächlich antientzündlich [7].

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) gehören zu einer Familie von Enzymen, die im aktivierten Zustand alle Komponenten der extrazellulären Matrix abbauen können. Im arthrotischen Knorpel sind vor allem die Kollagenasen, Stromelysine und Gelatinasen erhöht. Sie haben ihre optimale enzymatische Aktivität im physiologischen pH-Bereich. Es ist nachgewiesen worden, dass Chondrozyten im Gelenkknorpel eine Vielzahl dieser Enzyme synthetisieren können und dass deren Aktivität durch höhere Synthese, erhöhte Aktivierung von Proenzymen oder durch verminderte Aktivität ihrer Inhibitoren in arthrotischen Gelenken erhöht ist [9]. Kollagenase-1, -2 und -3 sind in Zellen aus arthrotischem Knorpel identifiziert worden und ihre Konzentration korrelierte dabei gut mit der Stärke der histologischen Veränderungen im Knorpel. Auch in der Synovialflüssigkeit arthrotischer Gelenke wurde eine erhöhte Enzymaktivität von Stromelysin und Kollagenasen gemessen. Gelatinase B wurde nur in arthrotisch verändertem Knorpel nachgewiesen, jedoch nicht in gesundem [23]. Die Aktivität dieser Enzyme im Extrazellularraum wird durch spezifische Inhibitoren (tissue inhibitors of matrix-metalloproteinases = TIMPs) reguliert. Es handelt sich dabei um Glykoproteine, die - bedingt durch eine hohe Affinität zu den MMPs - feste Komplexe mit ihnen bilden und sie dadurch inaktivieren. Erhöhte MMP-Spiegel sind sowohl im arthrotischen Knorpel des Menschen als auch im experimentellen Tiermodell gemessen worden. Ihr spezifischer Inhibitor (TIMP) war im Knorpel und in der Synovia von Patienten mit Osteoarthrose leicht erhöht, aber nicht in dem Maße wie die Enzyme. Dies lässt vermuten, dass ein Ungleichgewicht zwischen Metalloproteinasen und ihren Inhibitoren eine Rolle bei der Progression der Osteoarthrose spielt. Es besteht ein relativer Mangel der Inhibitoren [69].

IL-4, IL-10 und IL-13 gehören zu der Gruppe der regulatorisch wirkenden Faktoren. Sie können die Produktion von destruierenden Zytokinen wie IL-1 und TNF durch Makrophagen oder Chondrozyten hemmen und zusätzlich auch die Synthese der Inhibitoren dieser Zytokine wie z. B. IL-1ra steigern. IL-4 hat auch einen direkten protektiven Effekt auf Chondrozyten, indem es die Menge an NO-Synthetase reduziert. Dieses Enzym ist stark an der Bildung von Stickoxid in Chondrozyten nach Exposition mit IL-1 beteiligt und vermittelt den größten Teil des inhibitorischen Effekts von IL-1 auf die Synthese von Proteoglykanen [7].

Interleukin-6 (IL-6) wird auch als beteiligter Faktor in der Pathogenese der Arthrose diskutiert. Es erhöht die Zahl der Entzündungszellen im Synovialgewebe, induziert die

Proliferation von Chondrozyten und verstärkt die Effekte von IL-1 auf die Synthese von Metalloproteinasen und die Inhibition der Proteoglykansynthese. Da Interleukin-6 die Produktion von TIMP induziert, jedoch nicht die der Metalloproteinasen selbst, könnte dieses Zytokin an einem Feedback-Mechanismus beteiligt sein, der der Knorpelzerstörung entgegenwirkt [47]. In einer in-vivo-Studie an IL-6-defizienten Mäusen zeigte sich eine verminderte Entzündung im Gelenk, aber eine stark erhöhte Zerstörung des Knorpels [44].

Wachstumsfaktoren wie der insulin-like growth factor-1 (IGF-1) wirken nicht direkt auf die Produktion oder Funktionen von IL-1, können aber dem katabolen Effekt von IL-1 entgegenwirken. IGF-1 ist unter physiologischen Bedingungen der wichtigste anabole Wachstumsfaktor im erwachsenen Gelenkknorpel. Erniedrigte Konzentrationen dieses Zytokins führen zu reduzierter Proteoglykansynthese in den Chondrozyten und verstärken den Abbau von Proteoglykanen. Zusätzlich zu IGF-1 gibt es noch andere Wachstumsfaktoren, die die Syntheseaktivität von Chondrozyten stimulieren können. Beispiele sind der transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ), der fibroblast growth factor (FGF) und der platelet derived growth factor (PDGF). TGF- $\beta$  stimuliert Chondrozyten normalerweise nur sehr schwach. Es kommt jedoch bei längerer Exposition der Chondrozyten mit diesem Wachstumsfaktor zu einer Veränderung des Phänotyps und damit zu einer Sensibilisierung gegenüber TGF- $\beta$ . Stimulation mit TGF- $\beta$  führt dann zu einer deutlichen Steigerung der Synthese von Proteoglykanen und zu einer Entkopplung von Entzündungsprozessen und Knorpelzerstörung. TGF- $\beta$  stimuliert weiterhin die Leukozyteneinwanderung in die Synovia und die Proliferation von Fibroblasten, reduziert aber gleichzeitig deutlich den Proteoglykanabbau im Knorpel [7].

Insgesamt ist die Knorpeldestruktion im Rahmen der Arthrose durch ein kompliziertes Zusammenspiel einer großen Zahl von Mediatoren bedingt. Im Vergleich zum gesunden Knorpel ist eine überschießende Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren nachzuweisen. Das zerstörte Gleichgewicht zwischen protektiven und destruktiven Zytokinen spielt dabei eine wesentlich wichtigere Rolle als die absoluten Spiegel der destruktiven Mediatoren.

## 1.2.4 Therapie

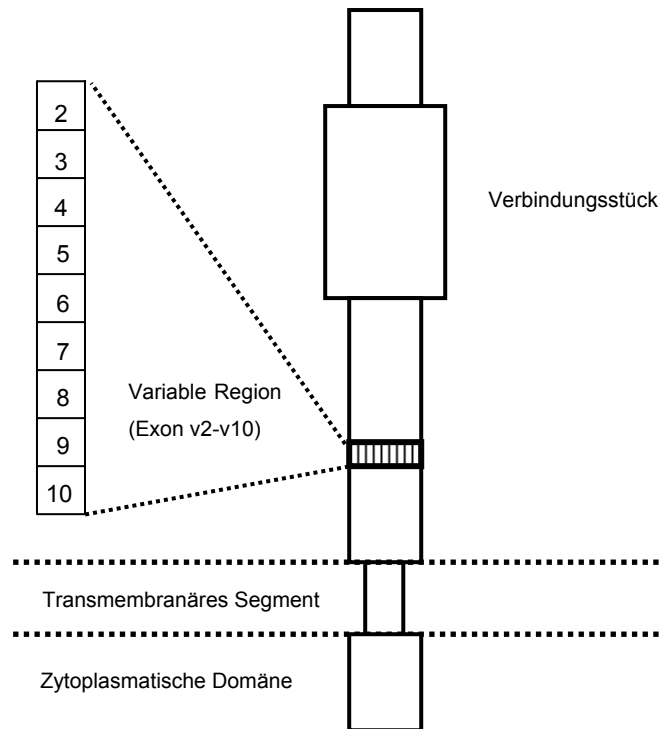
Die Behandlung der Arthrose kann grob in die konservativen und die chirurgisch-orthopädischen Verfahren unterteilt werden.

Die konservative Behandlung der Arthrose besteht heute im Wesentlichen in dem Versuch, vorhandene Beschwerden zu lindern und die Progredienz dieser Gelenkerkrankung soweit wie möglich zu bremsen. Zur medikamentös-symptomatischen Behandlung der Arthrose stehen die schnell wirksamen nichtsteroidalen Antiphlogistika - wie zum Beispiel Diclofenac oder Tiaprofensäure - und verschiedene Analgetika (z.B. Paracetamol, Flupirtin) zur Verfügung. Ferner gibt es noch eine Gruppe von Medikamenten mit verzögertem Wirkungseintritt (Slow Acting Drugs in Osteoarthritis: "SADOAs"). Hierzu zählen Ademethionin (Gumbaral<sup>®</sup>), D-Glucosaminsulfat (Dona 200 S<sup>®</sup>), Oxaceprol (AHP-200<sup>®</sup>) und Hyaluronsäure (Hyalart<sup>®</sup>). Diese Medikamente zeichnen sich durch antiphlogistische und zum Teil auch analgetische Wirkung aus. Die in manchen Tierversuchen nachgewiesenen chondroprotektiven Effekte sind noch umstritten. In Ergänzung zu den medikamentösen Behandlungsstrategien gibt es noch mechanische, konservative Möglichkeiten wie Fersenpuffer, Schuhranderhöhungen, Knieschienen und Gewichtsabnahme. Für alle aufgezählten konservativen Methoden ist die tatsächliche Beeinflussung des Verlaufs der Arthrose noch nicht eindeutig nachgewiesen. Lediglich die symptomatische, also die Schmerzlinderung, konnte in den meisten Fällen nachgewiesen werden.

Aus chirurgischer Sicht besteht die Möglichkeit mit einer Gelenkspiegelung und Ausspülung des Gelenks für einen gewissen Zeitraum Schmerzfreiheit zu erzielen. Wenn nur ein Kompartiment des Kniegelenks betroffen ist kann eine so genannte Umstellungsosteotomie erfolgen, die die Last auf den weniger stark betroffenen Knorpelanteil verteilt. Aufgrund der Verschlechterung der Symptome mit zunehmendem Alter stellt der Ersatz der zerstörten Gelenkflächen durch eine künstliche Endoprothese in den meisten Fällen ein unumgängliches Behandlungsverfahren am Kniegelenk dar. Ein Gelenkersatz wird jedoch erst nach dem 60. Lebensjahr angestrebt. Die Behandlung jüngerer Patienten ist problematisch, da alle Endoprothesen nur eine begrenzte Haltbarkeit haben. Die Versorgung mit Endoprothesen ist somit limitiert und der Patient ist letztlich in vielen Fällen auf einen Rollstuhl angewiesen [20].

## 1.3 CD 44

CD44 ist ein transmembranäres Oberflächenmolekül, das auf einer Vielzahl menschlicher Zellen exprimiert wird. Es wurde erstmals 1980 als ein neues Oberflächenprotein auf Leukozyten identifiziert [18]. Nachträglich stellte man fest, dass zumindest zwei andere bis dahin bekannte transmembranäre Proteine, die durch zwei verschiedene monoklonale Antikörper identifiziert wurden, mit CD44 identisch waren [45],[72]. 1989 wurden cDNA-Klone einer wichtigen Isoform von CD44 auf hämatopoetischen Zellen isoliert (CD44H) [67]. Die Aminosäuresequenz dieser Isoform (90 kDa) zeigte ein Typ-1-transmembranäres Protein, bei dem das N-terminale Ende außerhalb und das C-terminale Ende innerhalb der Zelle lokalisiert ist. Es besteht aus einer aus 248 Aminosäuren bestehenden extrazellulären Domäne, einem 21 Aminosäuren langen transmembranären Segment und einer zytoplasmatischen Domäne bestehend aus 72 Aminosäuren. Das N-terminale Ende zeigte Ähnlichkeiten zu Bindungsproteinen im Knorpel. 1990 und 1991 wurden weitere Isoformen von CD44 geklont, darunter war auch eine Isoform, die auf epithelialen Zellen exprimiert wird [68], [24]. Analysen der genomischen Struktur von CD44 zeigten 19 Exone (e1-e19) [62]. Zwei weitere Exone e6a und e13a wurden nachträglich identifiziert [78], [61]. CD44 besteht aus 21 Exonen, von denen zumindest 9 variabel gespleißt werden können. Es handelt sich dabei um die Exone e6a - e14, die mit den variablen Exonen v2 - v10 übereinstimmen, und um e13a. Das Exon v1 wurde aus Rattenzellen isoliert und findet sich in der menschlichen DNA nicht [66]. Wie Abbildung 1 zeigt liegen die variablen Exone in der membrannahen extrazellulären Region ungefähr dort, wo die Ähnlichkeit der CD44-Rezeptoren zu anderen Molekülen endet. Alternatives Spleißen dieser Exone erhöht die Vielfalt der CD44-Isoformen, auch wenn offenbar nicht alle Kombinationen der variabel gespleißten Exone exprimiert werden.



**Abbildung 1** schematische Darstellung des CD44-Rezeptors (Abbildung nach J.Bajorath, Proteins: Structure, Function and Genetics (2000))

CD44-Isoformen sind auf vielen Zellen verschiedener Gewebe zu finden (z.B. Zellen des Immunsystems, epitheliale Zellen, Knorpelzellen) Sie werden zellspezifisch exprimiert, wobei inzwischen mindestens 30 verschiedene Isoformen charakterisiert worden sind. Unter den am meisten vorkommenden sind CD44E und CD44H. Die Expression von bestimmten variabel gespleißten Exonen ist direkt verantwortlich für bestimmte Eigenschaften von CD44. Zum Beispiel sind Isoformen, die das Exon v6 enthalten, eng mit der Metastasierung von Tumoren assoziiert [26].

Die strukturelle Vielfalt von CD44 wird durch eine häufige und isoformspezifische, posttranslationale Modifikation, wie zum Beispiel N- und O- gebundene Glykosylierung und das Binden von Glykosaminoglykanen, verstärkt. Die Glykosylierung variiert stark und hängt vom Zelltyp und von extrazellulären Faktoren ab. Die 341 Aminosäuren der CD44H-Isoform haben z.B. nur eine Molekularmasse von ca. 37 kDa. Eine umfassende Glykosylierung der extrazellulären Domäne erhöht die Molekularmasse des Proteins auf ungefähr 90 kDa [3]. Es ist daher nicht überraschend, dass die posttranslationale Modifikation die Bindungseigenschaften und die Funktionen von CD44 moduliert. Die verschiedenen Isoformen von CD44 scheinen dabei eine jeweils



charakteristische Form der Glykosilierung zu haben. CD44s trägt eine kleinere Fraktion von Chondroitinsulphat, während CD44 auf Keratinozyten grundsätzlich mit Heparansulphat glykosiliert ist. Es gibt Isoformen, die sowohl in der glykosilierten als auch in der nicht-glykosilierten Form auftreten, was nahe legt, dass einige Funktionen des Moleküls nicht durch die Glykosilierung beeinflusst werden [29].

Diese strukturelle Vielfalt von CD44 korreliert mit einer großen Anzahl von noch nicht klar trennbaren Funktionen im Rahmen der Zelladhäsion, Signaltransduktion und der interzellulären Kommunikation. CD44 ist an der Interaktion zwischen Leukozyten und epithelialen Zellen beteiligt [19]. Es fungiert als ein Signalmolekül, das über Tyrosinkinase die Expression von Chemokinen in Makrophagen induziert [48]. Außerdem kann CD44 Wachstumsfaktoren und Chemokine präsentieren und binden. CD44-Rezeptoren, die das Exon v3 enthalten und Heparansulfat gebunden haben, können zum Beispiel Heparin-bindende Wachstumsfaktoren präsentieren [5]. CD44 spielt auch eine Rolle bei der Aktivierung von Lymphozyten [64], der Myelo- und Lymphopoese [50] und der Angiogenese [70].

Es sind mehrere Liganden des CD44-Rezeptors identifiziert worden, darunter Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat [2], Kollagen [11] und die heparinbindende Domäne von Fibronectin [35]. CD44 ist der wichtigste Zelloberflächenrezeptor für Hyaluronsäure. Er bindet Hyaluronsäure über eine Aminosäuresequenz am N-terminalen Ende, die Ähnlichkeit zu hyaluronsäure-bindenden Proteinen im Knorpel hat, wie zum Beispiel zu bestimmten Regionen von Aggrecan. Diese Sequenz befindet sich in der konstanten extrazellulären Domäne von CD44 [39]. Mutationen in diesen Regionen - zum Beispiel von Arg 41 - vermindern oder verhindern die Bindung von Hyaluronsäure an den CD44-Rezeptor. Verschiedene Faktoren regulieren die Interaktion zwischen CD44 und Hyaluronsäure. Die Isoform spielt dabei eine wichtige Rolle. CD44E (150 kDa) zum Beispiel kann Hyaluronsäure nicht binden. Die Fähigkeit von CD44v, Hyaluronsäure zu binden, scheint durch seine variablen Exone reduziert zu werden. Wenn ein Teil der variablen Region durch eine andere Proteinsequenz ersetzt wird, erhöht sich die Bindungsfähigkeit an Hyaluronsäure. Dieser inhibitorische Effekt der variablen Exone wird durch ihre Glykosilierung beeinflusst. CD44v bindet Hyaluronsäure genauso gut wie CD44s, wenn es nicht glykosiliert ist [6]. Als ein weiterer Faktor kann der extrazelluläre Anteil von CD44 zu einer Ansammlung von CD44 auf der Zelloberfläche führen und so die Interaktion zwischen CD44 und Hyaluronsäure erhöhen [12].

CD44 ist auch am Abbau von Hyaluronsäure beteiligt. Der Komplex aus CD44 und Hyaluronsäure wird in die Zelle aufgenommen und in den Lysosomen durch Hydrolasen abgebaut. Proliferierende Zellen exprimieren eine hohe Zahl von CD44-Rezeptoren. In diesen Bereichen ist die Hyaluronsäurekonzentration niedrig und es wird vermutet, dass ein lokalisierter Abbau von Hyaluronsäure zu einer morphologischen Veränderung des Gewebes führt [71].

CD44 wird von einigen Zellen für hyaluronsäureabhängige Adhäsionsprozesse gebraucht. Diese können durch Zugabe von Hyaluronidase, niedrige Konzentrationen von Hyaluronsäure oder monoklonale Antikörper gegen CD44 reduziert werden [25]. Die Bindung von CD44 an Hyaluronsäure ist im Vergleich zu anderen Mechanismen der Zelladhäsion (z.B. über Cadherine oder Integrine) relativ schwach. Es wird vermutet, dass dies dort ein Vorteil ist, wo Zellen die Bindung nur zum Austausch chemischer Signale benötigen [71]. Dies könnte bei der Aktivierung und Reifung von Lymphozyten eine Rolle spielen.

Experimente mit hämatopoetischen Zellen zeigten, dass es drei mögliche Zustände des CD44-Moleküls zu geben scheint: inaktiv, aktiv und durch Stimulation aktivierbar. Auch wenn CD44 durch eine Zelle exprimiert wird, kann er in inaktiver Form vorliegen oder zur Aktivierung die Stimulation durch Lipopolysaccharide, Zytokine oder Antikörper benötigen [43].

### **1.3.1 CD 44 in der Tumorforschung**

CD44 spielt eine wesentliche Rolle in der Erforschung von Zelldifferenzierung, Invasion und Metastasierung in der Tumorphologie. 1991 gelang es Gunthert et al. [26] das metastatische Potential eines Adenokarzinoms der Ratte auf ein nicht-metastasierendes Adenokarzinom zu übertragen, indem sie die für eine Form des CD44-Rezeptors kodierende cDNA des metastasierenden Karzinoms auf das nicht-metastasierende übertrugen. Dieses Phänomen wurde auch an Mammakarzinomen gezeigt. Guo et al. [27] zeigten, dass monoklonale Antikörper gegen CD44 die Bindung von Melanomzellen an Hyaluronsäure in vitro unterbinden und auch die Metastasierung in vivo verhindern. Hofmann et al. [31] beschrieben, dass die Expression von CD44v in geklonten embryonalen Fibroblasten von Ratten mit ihrem metastatischen Potential korrelierten. Bei immunsupprimierten Tieren reichte schon die

Expression geringer Mengen von CD44v aus, um die Fähigkeit zur Metastasierung zu übertragen. Die CD44v-Expression dieser Zellen konnte durch Übertragung des aktivierten Onkogens ras erhöht werden.

Inzwischen ist eine hohe CD44-Expression in vielen Typen von malignen Tumoren nachgewiesen worden. Dazu gehören Karzinome, Gliome und Non-Hodgkin-Lymphome. Da CD44 auf einer großen Zahl von Zelltypen exprimiert wird, haben viele Studien die Expression von CD44 auf den Tumorzellen mit dem entsprechenden normalen Gewebe verglichen. Tumore, die von epithelialen Zellen abstammen, die normalerweise CD44-positiv sind, bleiben weiterhin positiv und produzieren häufig höhere Konzentrationen von CD44-RNA [76]. Allerdings gibt es auch gegenteilige Ergebnisse. In von Hudson et al. [33] untersuchten Plattenepithelkarzinomen wurde eine verminderte Expression von einem oder mehreren in gesundem Plattenepithel vorkommenden Exonen festgestellt. Diese verminderte Expression von CD44-Varianten war in den am wenigsten differenzierten Arealen und den Fernmetastasen am stärksten ausgeprägt.

Es gibt einige Theorien zur Rolle von CD44 in der Tumorphathologie. Die Expression von CD44 ist mit einer hohen Zellteilungsrate assoziiert. Die Zellteilung von Tumoren, die auf mit CD44v6-Antikörpern beschichteten Platten wachsen, erhöht sich. Interaktionen des CD44-Rezeptors mit seinen Liganden könnten die Produktion autokriner Wachstumsfaktoren in Tumorzellen induzieren.

Neben seiner Rolle in der Zelladhäsion spielt CD44 auch bei der Übertragung intrazellulärer Signale eine Rolle. Diese Tatsache könnte CD44 befähigen, Zellteilung und Zellwachstum zu beeinflussen. Tumorzellen, die CD44 exprimieren, können sich mittels seiner Liganden - zum Beispiel Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat oder Fibronectin - an die extrazelluläre Matrix binden. Die Konzentration von Hyaluronsäure kann mit der Invasivität und dem metastatischem Potential eines Tumors korrelieren [79]. Hyaluronsäure öffnet durch ihre Wasserbindungskapazität den Interzellularspalt, durch den die Tumorzellen sich bewegen können. Dieser Faktor könnte den Tumorzellen das Eindringen in gesundes Gewebe erleichtern. Die Aufnahme und der Abbau von Hyaluronsäure durch den CD44-Rezeptor könnte das Eindringen von Tumorzellen in hyaluronsäurereiche Gewebe ermöglichen. In manchen Mammakarzinomen korrelierte der durch CD44 vermittelte Abbau von Hyaluronsäure besser mit der Invasivität des Tumors als die CD44-Expression.

Im Rahmen der Metastasierung müssen sich die Adhäsionseigenschaften einer Tumorzelle ändern. Dies könnte durch eine Veränderung der CD44-Dichte an der

Oberfläche der Zellen bedingt sein, da CD44 - wie oben beschrieben - eine wichtige Rolle bei der Interaktion von Zellen mit Nachbarzellen oder mit der extrazellulären Matrix spielt. Eine erhöhte Expression von CD44 kann die Bindung an Hyaluronsäure oder hyaluronsäurereiche Matrix erhöhen und die Bindung an undifferenzierte Tumorzellen erniedrigen. Diese erhöhte Mobilität der Zelle könnte CD44 über seine Verbindung zum Zytoskelett der Zelle vermitteln. Der CD44-vermittelte Abbau von Hyaluronsäure könnte auch von der Tumorzelle genutzt werden, um durch die Basalmembran in Blut- oder Lymphgefäße einzudringen. In einem Tiermodell zur Erforschung der lymphatischen Metastasierung konnte durch Gabe von CD44-Antikörpern die Zahl neuauftretender Metastasen gesenkt werden, nicht jedoch das Wachstum schon vorhandener Metastasen beeinflusst werden [66].

### **1.3.2 CD 44 in der Arthroseforschung**

Die Pathogenese der Arthrose ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht vollständig geklärt. Zunehmend werden verschiedene Faktoren entdeckt, die in der Pathogenese der Arthrose eine Rolle spielen könnten. In den letzten Jahren gibt es immer mehr Studien, die auf eine Beteiligung des CD44-Rezeptors bei der Entstehung der Arthrose hinweisen. Salter et al. [58] wiesen 1996 mittels immunhistochemischer Untersuchungen nach, dass sowohl gesunder als auch arthrotischer menschlicher Knorpel CD44-Rezeptoren exprimiert. CD44H wurde auf allen Chondrozyten nachgewiesen, während eine Expression von CD44E, der epithelialen Form, in keiner Probe nachgewiesen wurde. Zusätzlich ließen sich verschiedene Isoformen in geringeren Mengen nachweisen, die jedoch nicht genau charakterisiert wurden. 1997 wiesen Ostergaard et al. [54] CD44 sowohl im Knorpel arthrotischer als auch im Knorpel makroskopisch gesunder menschlicher Femurköpfe nach. Es zeigte sich in der oberflächlichen Zone des Knorpels kein signifikanter Unterschied bezüglich der Intensität der Färbung von arthrotischem und gesundem Knorpel. Dagegen ließ sich in der tiefen Zone des Knorpels eine gegenüber gesundem Knorpel vermehrte Färbung von CD44 im arthrotischen Knorpel nachweisen. Cheryl Knudson et al. [38] untersuchten die perizelluläre Matrix embryonaler Hühnerchondrozyten und erwachsener Rattenchondrozyten. Nach Entfernung der perizellulären Matrix durch Hyaluronidase konnten sie durch Zugabe von Hyaluronsäureoligosacchariden, die eine

kompetitive Hemmung des CD44-Rezeptors bewirken, eine Neusynthese verhindern. Bei intakter perizellulärer Matrix führte eine Zugabe der Hyaluronsäurefragmente zu einem Verlust der Matrix. CD44 spielt somit eine Rolle bei der Verankerung der extrazellulären Matrix am Chondrozyten. 1998 hemmten Chow et al. [15] die Transkription des CD44-Rezeptors in menschlichen Knorpelzellen. Infolge dieser Blockierung traten ein deutlicher Proteoglykanverlust und hohe Konzentrationen von Aggrekanfragmenten auf, die auf einen enzymatischen Abbau der extrazellulären Matrix schließen lassen. Dies beweist einen aktiven Abbau der Matrix und widerspricht einer passiven Abdiffusion. Nishida et al. [52] wiesen nach Behandlung menschlichen Knorpels mit IL-1 eine Steigerung der CD44mRNA-Synthese um das Dreifache nach. Die Hochregulation von CD44 wurde dabei besonders in den Regionen nachgewiesen, in denen der Proteoglykanverlust am stärksten war. In einer Studie von Knudson et al. [40] wurden Kulturen von tierischen und von menschlichen Chondrozyten-Kulturen mit Hyaluronsäureoligosacchariden behandelt, um die CD44-Rezeptoren kompetitiv zu blockieren. Es kam zu einem zeit- und dosisabhängigen Matrixverlust, einer um das Achtfache erhöhten Proteoglykanabgabe ins Medium, einer erhöhten Neusynthese von Proteoglykanen und einer erhöhten Gelatinase-Aktivität. Die Chondrozyten zeigten somit deutliche katabole Reaktionen auf die blockierte Interaktion mit ihrer extrazellulären Matrix.

## **1.4 Fragestellung und Zielsetzung**

Trotz ständiger Bestrebungen die Therapie der Arthrose zu optimieren, gibt es derzeit keine kausale Therapie der Arthrose. Ein Grund dafür ist das immer noch unvollständige Wissen bezüglich der Entstehung und der Pathogenese der Arthrose.

Vorangegangene Studien zeigen eine Beteiligung des CD44-Rezeptors bei der Aufrechterhaltung der Homöostase des Knorpelstoffwechsels und bei der Verankerung der extrazellulären Matrix und legen eine Beteiligung dieses Rezeptors in der Pathogenese der Arthrose nahe. Es gibt jedoch bis jetzt nur wenige Informationen über die CD44-Expression in den Frühphasen der Arthroseentstehung. Da eine Probengewinnung bei beginnender Arthrose des Menschen aus ethischen und praktischen Gründen nicht möglich ist, kann eine Erforschung dieser Sachverhalte in vivo nur am Tiermodell stattfinden. Dabei sollte die Ätiologie der experimentellen

Arthrose der im menschlichen Gelenk vorkommenden Arthroseformen möglichst entsprechen.

Die vorliegende Studie soll die Entwicklung der Expression zweier Isoformen des CD44-Rezeptors in einer experimentell induzierten, sekundären Arthrose im Kaninchengelenk untersuchen. Sie soll eine mögliche Korrelation der morphologischen Veränderungen des Knorpels mit der CD44-Expression nachweisen.

## **2 Material und Methode**

### **2.1 Versuchsaufbau**

Die Versuchsreihe wurde mit 28 ausgewachsenen, weißen Neuseelandkaninchen durchgeführt. Die Tiere wurden in drei Versuchsgruppen aufgeteilt. Gruppe 1 erhielt beidseitig eine Eröffnung des Kniegelenks ohne weitere Eingriffe an Binnenstrukturen und anschließenden Wundverschluss. Sie dient als Kontrollgruppe. Gruppe 2 wurde nach Eröffnung des Kniegelenks beidseitig das vordere Kreuzband reseziert und anschließend das Gelenk verschlossen (Versuchsgruppe). Gruppe 3 erhielt keinerlei Operation. Allen Tieren aus Gruppe 1 und 2 wurde zum Zeitpunkt der Operation aus beiden Kniegelenken eine Probe der Synovialflüssigkeit entnommen. Aus Gruppe 1 und 2 wurden jeweils 4 Kaninchen 3, 6 und 12 Wochen nach der Operation getötet. Eine zweite Probe der Synovialflüssigkeit wurde zum Zeitpunkt der Tötung gewonnen. Die Tiere der Gruppe 3 wurden sofort getötet.

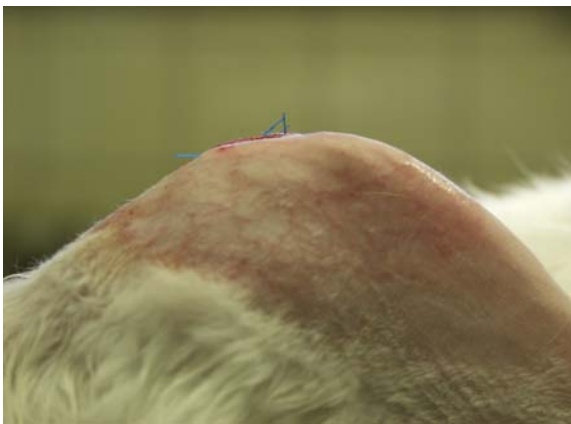
Der Tierversuch und die Haltung der Tiere wurden unter der Tierversuchsnummer G 49/2000 von der Bezirksregierung Münster und vom Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt Münster genehmigt.

### **2.2 Operationsmethode**

Alle Kaninchen wurden durch eine intramuskuläre Injektion mit Ketamin (10%, Sanofi-CEVA GmbH) und Xylazin (2%, CEVA) anästhesiert. Die Dosierung wurde individuell nach klinischer Beurteilung von Reflexen und Pupillenweite gewählt und variierte individuell stark. 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 von mediokaudal punktiert und jeweils 2 ml Kochsalzlösung (0,9 %) injiziert. Zur Verteilung der Spülflüssigkeit wurde jedes Kniegelenk zwanzigmal durchbewegt und anschließend wurde 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 Gruppe 1 (Kontrollgruppe) wurde das Kniegelenk anschließend lediglich mit 2 ml Kochsalzlösung (0,9 %) gespült und 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 (siehe Abbildung 2 und 3).



**Abbildung 2:** intraoperativer Lachmann-Test:  
Knie in Normalstellung



**Abbildung 3:** intraoperativer Lachmann-Test:  
deutlich nachweisbare vordere  
Schublade

Der Wundverschluss erfolgte in 2 Schichten. Nach Verschluss der Gelenkkapsel mit Einzelknopfnähten (2-0 Vicrylfäden, Ethicon) wurde die Haut mit Einzelknopfnähten (Prolene 3-0, Ethicon, Johnson & Johnson) adaptiert. Abschließend wurde 0,8 ml Novalgin (Hoechst Marion Roussel) subkutan und zur antibiotischen Prophylaxe 0,8 ml eines Breitbandantibiotikums (Tardomyocel) subkutan injiziert. Postoperativ konnten sich die Tiere frei in den Käfigen (100 cm x 70 cm x 40 cm) bewegen. Sie wurden engmaschig auf Infektionen und andere Komplikationen hin untersucht.





**Abbildung 4:** Postoperative Wundverhältnisse beider Kniegelenke



**Abbildung 5:** Ausschnitt der Wundversorgung des rechten Knies

## **2.3 Probenentnahme und Aufarbeitung der Proben**

### **2.3.1 Probenentnahme**

Die Kaninchen wurden mit Ketamin (10 %, Sanofi-CEVA) und Xylazin (2 %, CEVA) narkotisiert und dann mittels Durchtrennung der großen Halsgefäße getötet. Anschließend wurde aus jedem Knie eine Probe der Synovialflüssigkeit entnommen und beide Kniegelenke durch Querinzision der Patellarsehne eröffnet. Es wurden Femur, Tibia und Patella entnommen und bei - 80 Grad tiefgefroren.

### **2.3.2 Makroskopische Beurteilung**

Vor der Weiterverarbeitung der Proben wurden die entnommenen Gelenke von zwei unabhängigen Untersuchern nach 4 Kriterien makroskopisch beurteilt: Es wurde das Auftreten von Fibrillationen und Ulzerationen des Knorpels, das Ausmaß osteophytärer Anbauten und das Bestehen eines Ergusses bewertet. Den makroskopischen Befunden wurde nach Schweregrad ein Punktwert zugeordnet und die Einzelpunktwerte wurden addiert. Es ergeben sich Gesamtpunktwerte zwischen 0 und 11, wobei ein Punktwert von 0 einer makroskopisch gesunden Gelenkfläche und ein

Punktwert von 11 einer makroskopisch hochgradigen Arthrose entspricht (siehe Tabelle1).

<b>I</b>	<b>Fibrillationen</b>	<b>Grad</b>
	keine	0
	gering	1
	mittelgradig	2
	ausgeprägt	3
<b>II</b>	<b>Ulzerationen</b>	
	keine	0
	kleinflächig	1
	großflächig	2

<b>III</b>	<b>Osteophyten</b>	<b>Grad</b>
	keine	0
	gering	1
	mittelgradig	2
	ausgeprägt	3
<b>IV</b>	<b>Erguss</b>	
	kein	0
	gering	1
	mittelgradig	2
	groß	3

**Tabelle 1:** Makroskopische Beurteilung

### 2.3.3 Gewinnung der histologischen Schnitte

Nach Auftauen der Gelenkanteile in Formalinlösung (40 % gepuffertes Formalin) wurde jeweils der mediale Femurkondylus mittels einer Laubsäge entnommen und für 10 Wochen in EDTA (20 %; pH 7,4) bei 37°C entkalkt. Die entkalkten Proben wurden über Nacht mit fließendem Leitungswasser gespült, jeweils 6 Stunden über 50 %, 75 % und 90 % Isopropylalkohol und zweimal über Nacht in 100 % Isopropylalkohol bei 45 °C entwässert und für 12 Stunden in eine Isopropylalkohol- und Paraffinmischung (1:1) bei 60 °C überführt. Anschließend wurden die Proben für dreimal 12 Stunden bei 60°C in Paraffin gelegt. Es folgte die Einbettung der Proben in Paraffin mittels der Einbettstation AP280 der Firma Microm und die Härtung der Blöcke bei 6 °C im Kühlschrank. Es wurden mit dem Schlittenmikrotom der Firma Jung 5 µm dicke Schnitte angefertigt, die für die Übersichtsfärbungen mittels Eiweißglyzerin (10 Tropfen auf 100 ml destilliertes Wasser) auf Objektträger der Firma Engelbrecht fixiert wurden. Für die immunhistochemischen Färbungen wurden die Schnitte mittels destillierten Wassers auf Superfrost Plus Objektträger (Menzel) aufgebracht. Alle Schnitte wurden

bei 42°C auf dem Strecktisch und im Wärmeschrank gestreckt. Die vollständige Entkalkung wurde mittels einer Alizarin-rot-S-Färbung überprüft.

## **2.3.4 Färbeverfahren**

### **2.3.4.1 Hämatoxilin-Eosin-Färbung (HE)**

Die Schnittpräparate wurden für zweimal 5 Minuten in Xylol und dann jeweils in absteigender Reihe 5 Minuten in 100 %, 96 %, 70 % Ethanol und in destilliertem Wasser entparaffiniert. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten in die Färbelösung Hämalan nach Mayer gegeben und dann für 10 Minuten unter fließendem Wasser gebläut. Es folgte eine Färbung mit Eosin für 2 Minuten. Im Anschluss wurden die Schnitte kurz mit 70 % Ethanol abgespült. Die Proben wurden dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe 2 Minuten in 96 % Ethanol, zweimal 5 Minuten in 100 % Ethanol und zweimal 5 Minuten in Xylol hochgeführt und mit Eukitt eingedeckt.

Die Färbung stellt Zellkerne, Kalk und Knorpelsubstanz blau dar, während sich Zytoplasma, Kollagenfasern, Bindegewebe und Erythrozyten in verschiedenen Rottönen einfärben.

### **2.3.4.2 Safranin-O-Färbung**

Die Schnitte wurden in der absteigenden Alkoholreihe über zweimal 5 Minuten Xylol, je 5 Minuten 100 %, 96 % und 70 % Ethanol und 5 Minuten destilliertes Wasser entparaffiniert. Nach 4-minütiger Färbung mit Weigert's Eisenhämatoxilin (Merck, Lösung A und B in Mischung 1:1) wurden die Proben kurz in angesäuerten Alkohol (1 ml konzentrierte Salzsäure in 100 ml 70 % Alkohol) gegeben. Anschließend wurden sie mit Leitungswasser für 5 Minuten fließend gewässert. Es folgten eine dreiminütige Färbung mit Echtgrün 0,02 %, 30 Sekunden Spülung mit 1% Essigsäure und eine Färbung mit Safranin-O für 5 Minuten. Dann wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe über je 5 Minuten 70 %, 96 % Ethanol, zweimal 5 Minuten 100 % Ethanol und zweimal 5 Minuten Xylol entwässert und mit Eukitt eingedeckt.

Nach Safranin-O-Färbung sind die Proteoglykane rot, das Zytoplasma grün und die Zellkerne schwarz angefärbt.

#### 2.3.4.3 Immunhistochemische Färbung CD44 v5 und v6

Die Schnitte wurden in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und jeweils 5 Minuten in destilliertem Wasser und in 0,05 M Tris-Puffer (pH: 7,4 - 7,6) gespült. Jede Probe wurde mit einem Fettstift (DAKO-Pen) umrandet und alle weiteren Schritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Die Objektträger wurden für 5 Minuten mit Wasserstoffperoxyd (3 % in Tris-Puffer) behandelt und dreimal 2 Minuten in Tris-Puffer gespült. Es folgte eine fünfminütige Behandlung mit Proteinase K (DAKO, S 3020) und eine Spülung von jeweils dreimal 2 Minuten mit destilliertem Wasser und Tris-Puffer. Nach zehnminütiger Einwirkung von Kälberserum (3 % BSA in Tris-Puffer) wurde der Primärantikörper gegen CD44v5 (Anti-CD44 var v5, Bender MedSystems, BMS115) in einer Verdünnung von 1:400 und der Antikörper gegen CD44v6 (Anti-CD44 var v6, BMS125) in einer Verdünnung 1:200 über Nacht bei 4°C auf die Schnitte gegeben. Die Kontrollen wurden nur mit Tris-Puffer inkubiert. Nach weiteren 20 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Schnitte dreimal 2 Minuten mit Tris-Puffer gespült. Anschließend wurde der Sekundärantikörper (DAKO ENVISION SYSTEMS, HRP Mouse, K4001) für 2 Stunden auf die Proben und die Kontrollen gegeben. Die Objektträger wurden dreimal für 2 Minuten in Tris-Puffer gespült und dann mit AEC (AEC+Substrate-Chromogen, DAKO, K3469) gefärbt. Der Farbstoff wurde nach 10 Minuten erneuert und die Schnitte weitere 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das AEC sorgfältig abgekippt und die Schnitte gründlich mit destilliertem Wasser gespült. Die Objektträger wurden dann mit Kaisers Glycerin Gelatine eingedeckt und dunkel gelagert.

#### 2.3.5 Histologische Beurteilung

Die histologische Beurteilung erfolgte mit dem Mankin Score [46]. Dabei wurden die mit HE und Safranin-O gefärbten Schnitte durch zwei Untersucher nach vier Gesichtspunkten beurteilt: Struktur, Zellverteilung und -dichte, Anfärbung durch Safranin-O und die Intaktheit der Knorpel-Knochen-Grenze. Die entsprechenden Punktwerte (siehe Tabelle 2) wurden addiert und ergaben eine Gesamtsumme zwischen 0 und 14. Der Wert 0 entspricht dabei einem histologisch gesunden Gelenkknorpel, der Wert 14 einer Arthrose im Endstadium.

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

**Tabelle 2:** Histologische Beurteilung nach Mankin

### 2.3.6 Auszählung von Zellen mittels Image Pro Plus

Zur Auswertung der immunhistochemischen Färbungen des CD44-Rezeptors wurden mittels einer Kamera (CoolSnap- Pro Color A00J82025, Media Cybernetics) Bilder der histologischen Schnitte gemacht. Die Auszählung der Zellen erfolgte mit der Software Image-Pro® Plus Version 4.1 für Windows TM. Zur Bestimmung der Gesamtzahl der Chondrozyten in einem Knorpelausschnitt wurden die Zellkerne einer Hämatoxylin-Färbung ausgezählt. Anschließend wurden die immunhistochemisch angefärbten CD44-positiven Zellen aus dem gleichen Knorpelabschnitt gezählt und zu der vorher bestimmten Gesamtzahl der Knorpelzellen in Beziehung gesetzt.

## **2.4 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung dieser Arbeit wurde mit Hilfe der Statistiksoftware SPSS 11.0 durchgeführt. Beim Vergleich der Gruppen mit den entsprechenden Kontrollgruppen wurde nach Überprüfung der Varianzgleichheit mit dem Levene-Test der modifizierte t-Test für unverbundene Stichproben und inhomogene Varianzen verwendet. Die Korrelation der untersuchten Merkmale des Knorpelgewebes untereinander wurde mit dem Korrelationskoeffizienten nach Spearman berechnet. Das Signifikanzniveau dieser Arbeit wurde mit  $p < 0,05$  angesetzt. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

### **3 Ergebnisse**

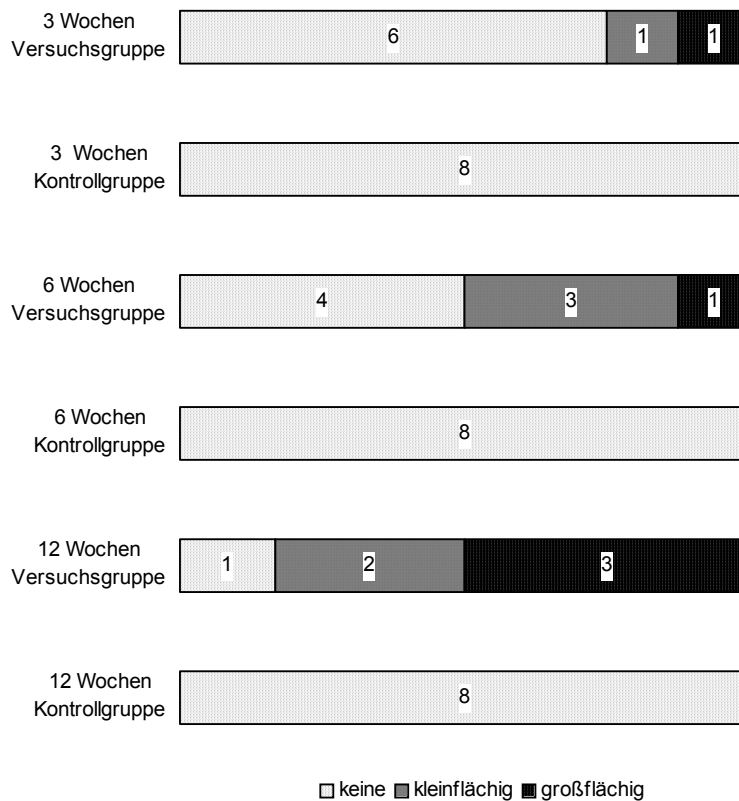
Der Versuch wurde mit 28 erwachsenen Neuseelandkaninchen durchgeführt. Die Tiere wogen zum Zeitpunkt der Operation durchschnittlich  $4193,75 \text{ g} \pm 298,84$ . Bei der Tötung lag das durchschnittliche Gewicht bei  $4274,64 \text{ g} \pm 462,49$ .

Ein Tier erkrankte vor der Operation und wurde nicht in den Versuch aufgenommen. Postoperativ kam es bei 2 Tieren zu Hämatombildung, die jedoch in beiden Fällen komplikationslos abheilte. Weiterhin entwickelte 1 Tier eine eitrige Wundinfektion, die sich unter einer einmaligen Gabe von 0,8 ml Tardomyocel schnell zurückbildete. Bei einem Tier musste aufgrund einer Wunddehiszenz in einer zweiten Operation die Kutis wieder verschlossen werden. Bei allen übrigen Tieren zeigte sich bei den Wundkontrollen ein komplikationsloser Heilungsverlauf.

Zum Zeitpunkt der Tötung war bei 11 Tieren der Gruppe mit Kreuzbanddurchtrennung diese auch nachweisbar. Bei einem Tier war das vordere Kreuzband intakt und es wurde aus der Auswertung genommen. Alle Tiere der Kontrollgruppe und die nicht operierten Tiere wiesen bei der Entnahme des Gelenkes ein intaktes vorderes Kreuzband auf.

#### **3.1 Knorpelschäden**

Die entnommenen Femurkondylen wurden auf makroskopische Veränderungen des Knorpels untersucht. In der Versuchsgruppe wiesen nach 3 Wochen 6 Gelenke keine Ulzerationen des Knorpels auf, 1 Gelenk zeigte kleinflächige und 1 Gelenk großflächige Ulzerationen. Nach 6 Wochen zeigten 4 Gelenke keinen bis auf den Knochen reichenden Knorpelschaden, 3 Gelenke wiesen kleinflächige und 1 Gelenk großflächige Ulzerationen auf. 12 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung wies nur noch 1 Gelenk keine bis auf den Knochen reichenden Defekte des Knorpels auf, 2 Gelenke zeigten kleinflächige, 3 Gelenke großflächige Ulzerationen (siehe Abbildung 6).

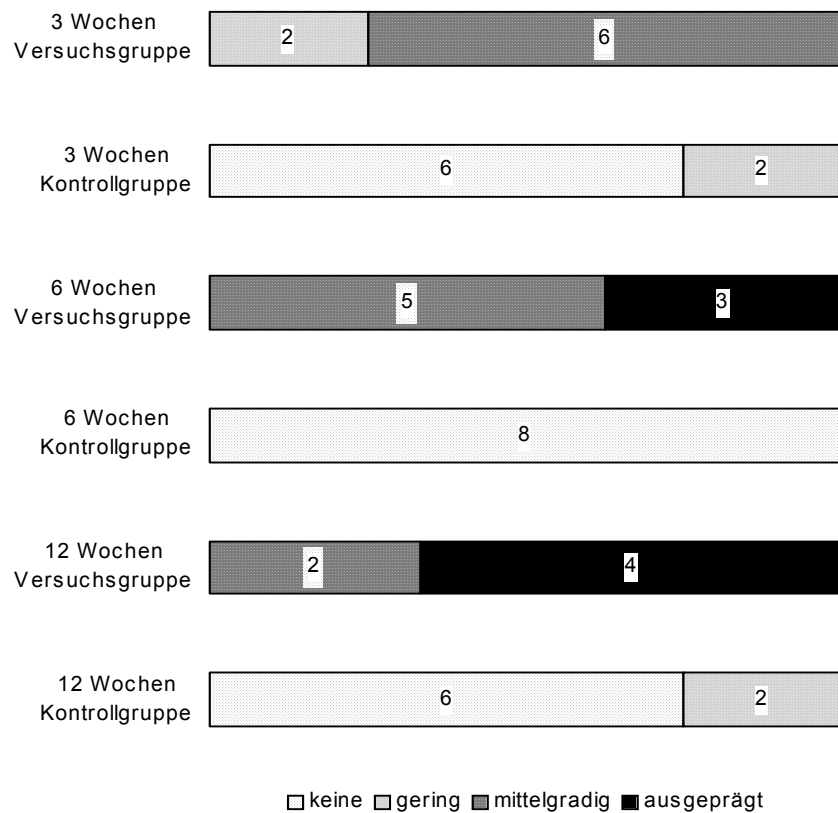


**Abbildung 6:** Anzahl der Gelenke mit Ulzerationen des Knorpels in Abhängigkeit der Wochen nach Operation

### 3.2 Osteophyten

In der Versuchsgruppe waren an allen Gelenken osteophytäre Anbauten zu sehen. Nach 3 Wochen zeigten 2 Gelenke geringe Osteophytenbildung und 6 Gelenke mittelgradige osteophytäre Anbauten. 6 Wochen nach Operation waren bei 5 Gelenken mittelgradige Osteophyten und bei 3 Gelenken ausgeprägte osteophytäre Anbauten nachweisbar. Nach 12 Wochen zeigten 2 Gelenke mittelgradige Osteophyten und 4 Gelenke ausgeprägte Osteophyten. In den Kontrollgruppen waren an 20 Gelenken keine Osteophyten nachweisbar, 4 Gelenke wiesen geringe osteophytäre Anbauten auf (siehe Abbildung 7).

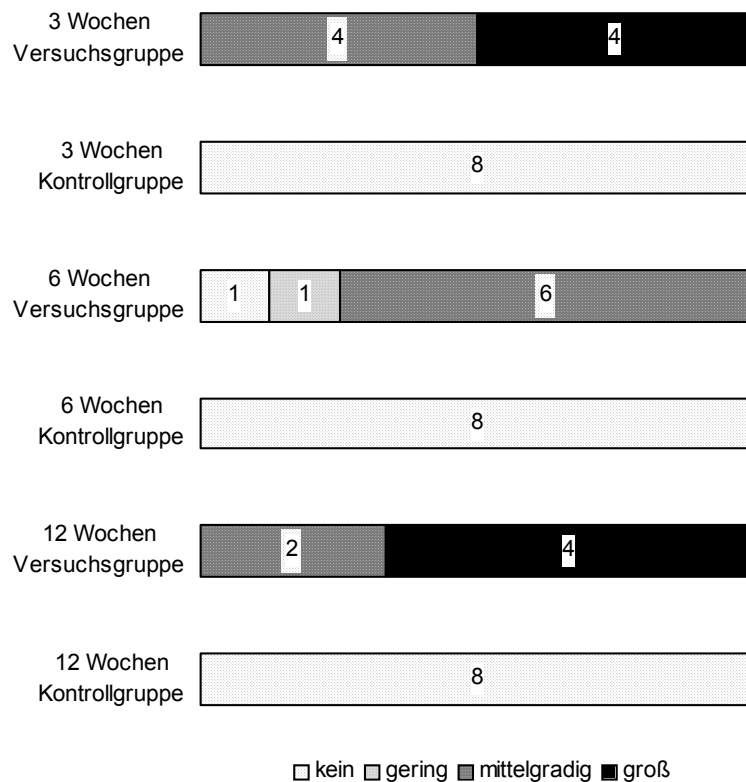




**Abbildung 7:** Anzahl der Gelenke mit osteophytären Anbauten in Abhängigkeit der Wochen nach Operation

### 3.3 Ergussbildung

Bei der Entnahme des Gelenkes erfolgten jeweils eine Entnahme von Synovialflüssigkeit und eine Schätzung der Ergussmenge. In der Versuchsgruppe zeigte sich nach 3 Wochen bei 4 Gelenken ein mittelgradiger und bei weiteren 4 Gelenken ein großer Erguss. Nach 6 Wochen war bei einem Gelenk kein Erguss, bei einem weiteren Gelenk ein geringer und bei 6 Gelenken ein mittelgradiger Erguss nachweisbar. 12 Wochen nach Operation zeigten 2 Gelenke einen mittelgradigen und 4 Gelenke einen großen Erguss. Kein Gelenk der Kontrollgruppen wies einen wesentlichen Erguss auf (siehe Abbildung 8).

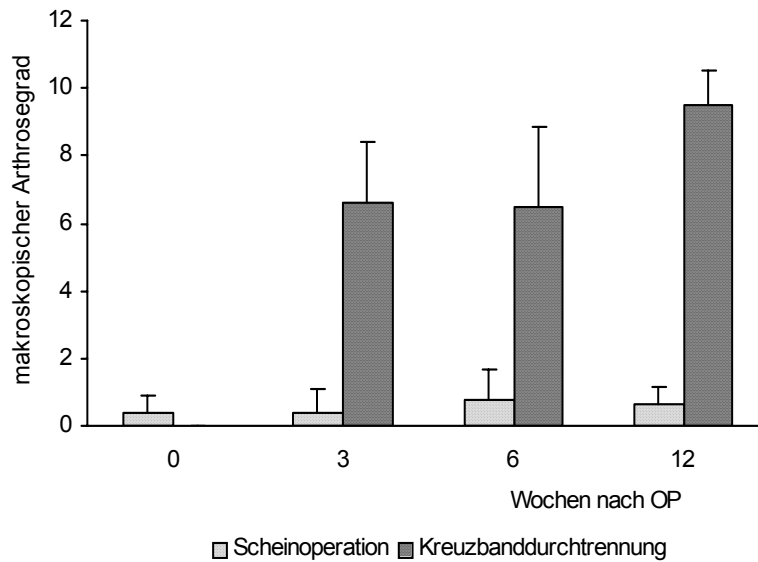


**Abbildung 8:** Anzahl der Gelenke mit Erguss in Abhängigkeit der Wochen nach Operation

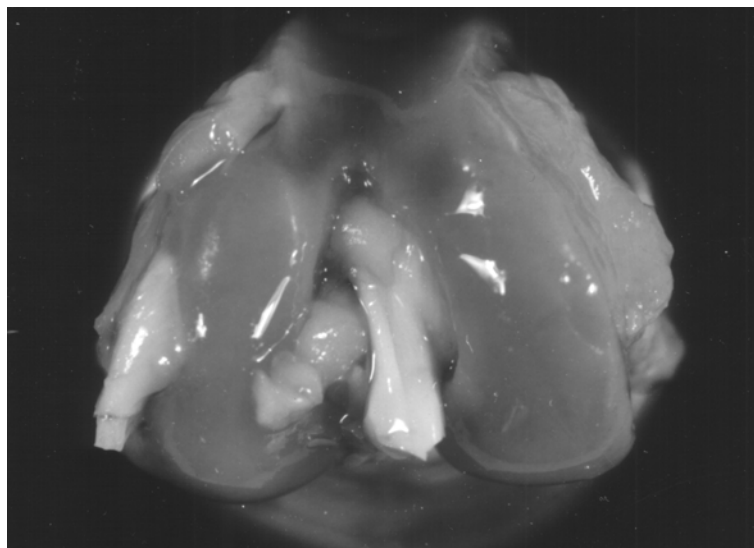
### 3.4 Makroskopischer Arthrosegrad

Es wurde jeweils die Gelenkfläche des Femur der insgesamt 54 Gelenke auf makroskopische Zeichen einer Arthroseentwicklung untersucht. Diese sind sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Gruppe nach Kreuzbanddurchtrennung nachweisbar, wobei in der Gruppe nach Kreuzbanddurchtrennung signifikant höhere Arthrosegrade beobachtet werden ( $p < 0,01$ ). Der Mittelwert des makroskopischen Arthrosegrades liegt in der Gruppe der nicht operierten Tiere bei  $0,375 \pm 0,518$ . In der Gruppe nach Scheinoperation beträgt er nach 3 Wochen  $0,375 \pm 0,744$ , nach 6 Wochen  $0,75 \pm 0,886$  und nach 12 Wochen  $0,625 \pm 0,518$ . Im Vergleich dazu liegt der makroskopische Arthrosegrad in der Gruppe nach Kreuzbanddurchtrennung nach 3 Wochen bei  $6,625 \pm 1,768$ , nach 6 Wochen bei  $6,5 \pm 2,33$  und nach 12 Wochen bei  $9,5$

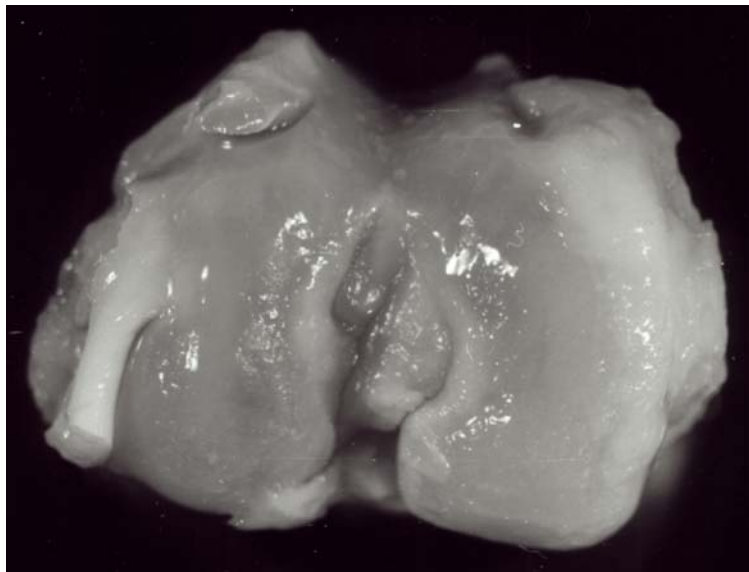
$\pm 1,049$ . Der makroskopische Arthrosegrad korreliert in dieser Gruppe positiv mit der Wochenzahl nach Operation (Korrelationskoeffizient: 0,519,  $p < 0,05$ ).



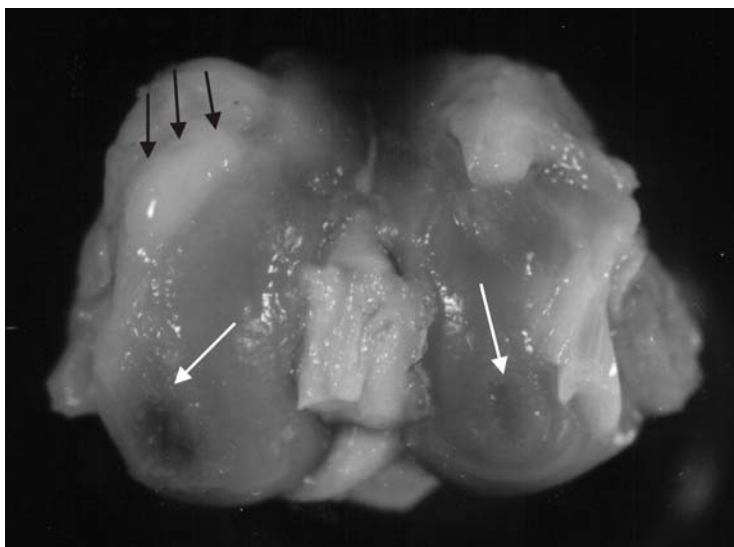
**Abbildung 9:** Vergleich des makroskopischen Arthrosegrades bei Scheinoperation bzw Kreuzbanddurchtrennung



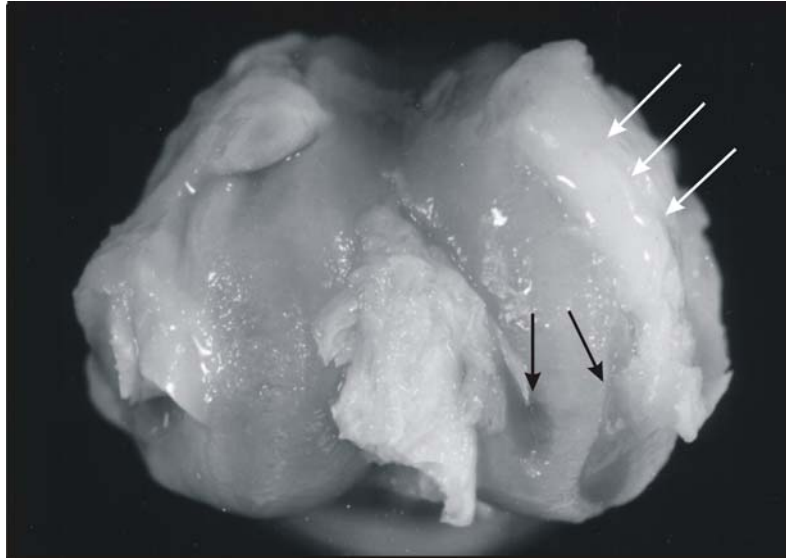
**Abbildung 10:** intakter Knorpel beider Femurkondylen eines nicht operierten Tieres



**Abbildung 11:** deutliche Fibrillationen und Osteophytenbildung beider Femurkondylen 3 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung



**Abbildung 12:** beginnende Knorpeldefekte bis auf den Knochen (weiße Pfeile) und ausgeprägte Osteophytenbildung (schwarze Pfeile) 6 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung



**Abbildung 13:** Freilegung des subchondralen Knochens (schwarze Pfeile) und ausgeprägte Osteophytenbildung (weiße Pfeile) 12 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung

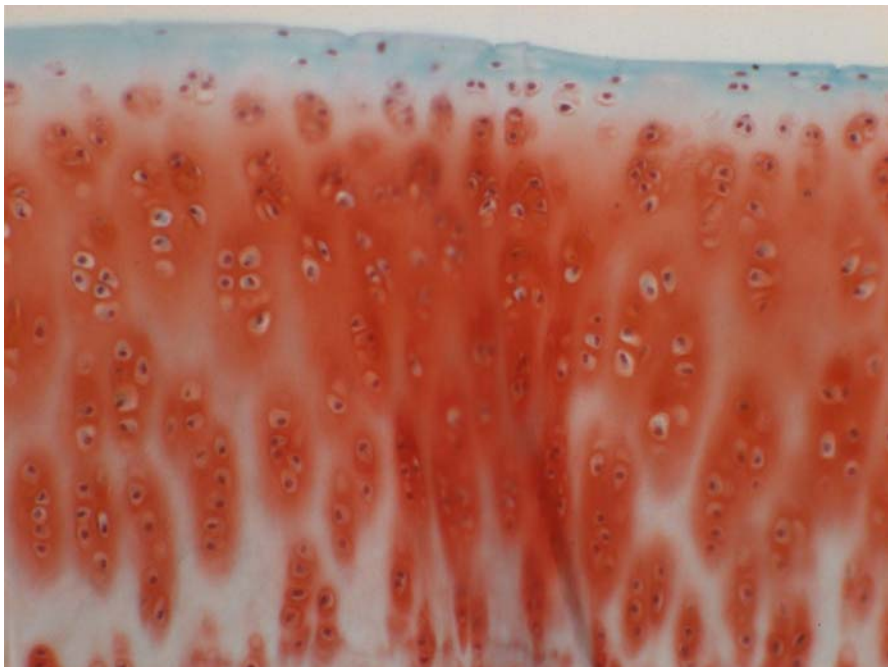
### 3.5 Proteoglykanverlust

Der Nachweis der Proteoglykane der extrazellulären Matrix zeigte einen mit Anzahl der Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung zunehmenden Proteoglykanverlust. In der Kontrollgruppe zeigten nach 3 Wochen ein Gelenk eine mäßige Reduktion der Proteoglykane, 5 Gelenke eine geringfügige Reduktion und 2 Gelenke keine Reduktion der Proteoglykane. Nach 6 Wochen zeigte ein Gelenk eine starke, 4 Gelenke eine geringfügige und 3 Gelenke keine Reduktion der Proteoglykananfärbung. 12 Wochen nach Scheinoperation war bei 2 Gelenken eine mäßige und bei 6 Gelenken eine geringfügige Reduktion der Proteoglykane nachweisbar.

In der Versuchsgruppe zeigten nach 3 Wochen 2 Gelenke einen totalen Proteoglykanverlust, 3 Gelenke eine starke Reduktion der Proteoglykane, 2 Gelenke eine mäßige Reduktion und ein Gelenk eine geringfügige Reduktion der Proteoglykane. Nach 6 Wochen war bei einem Gelenk ein totaler Proteoglykanverlust, bei 4 Gelenken eine starke Reduktion der Proteoglykane, bei 1 Gelenk eine mäßige und bei 2 Gelenken eine geringfügige Reduktion der Proteoglykananfärbung nachweisbar. 12 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung zeigten 1 Gelenk einen totalen Proteoglykanverlust und 5 Gelenke eine starke Reduktion der Proteoglykane.



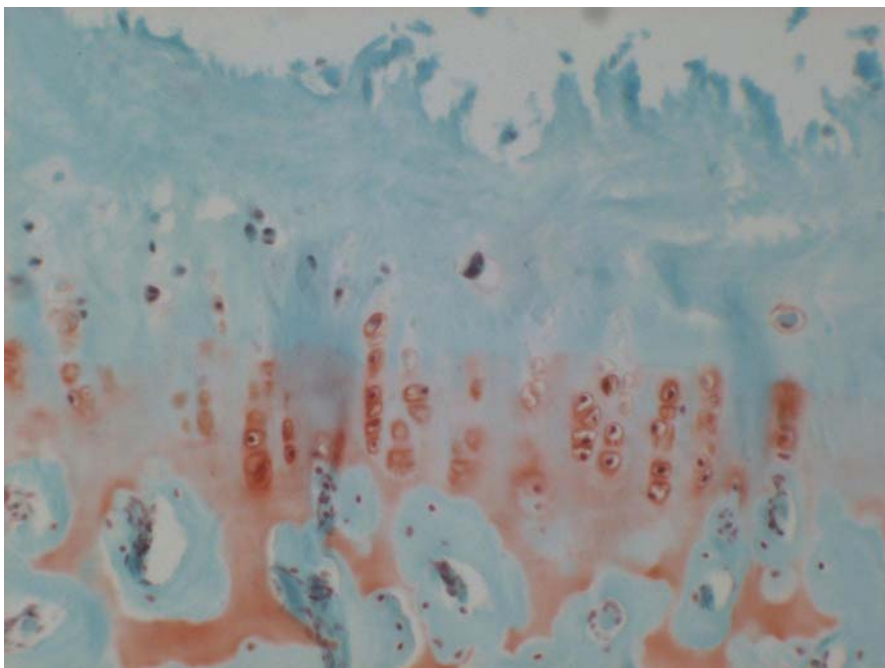
**Abbildung 14:** kräftige Anfärbung der Proteoglykane im Knorpel eines Tieres aus der Kontrollgruppe



**Abbildung 15:** beginnender Proteoglykanverlust im Knorpel 3 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung



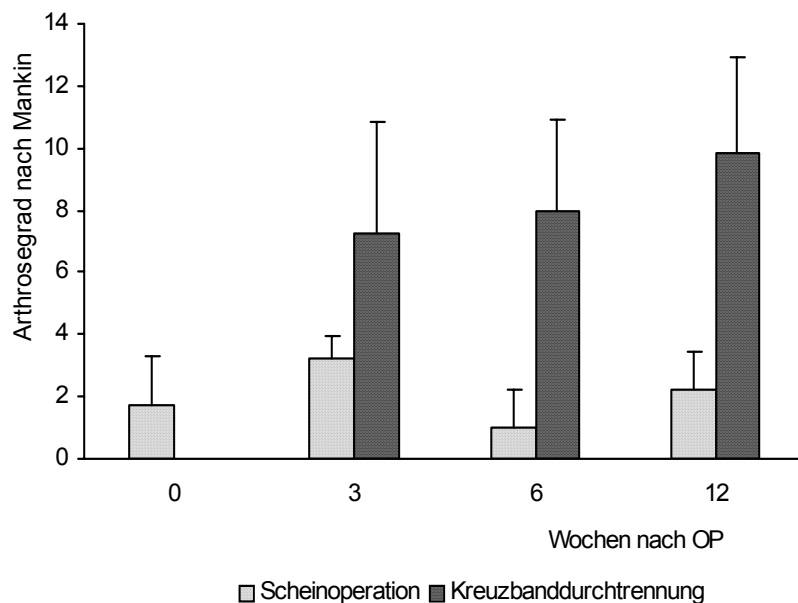
**Abbildung 16:** fortgeschrittener Proteoglykanverlust 6 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung



**Abbildung 17:** fast vollständiger Verlust der Proteoglykane 12 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung

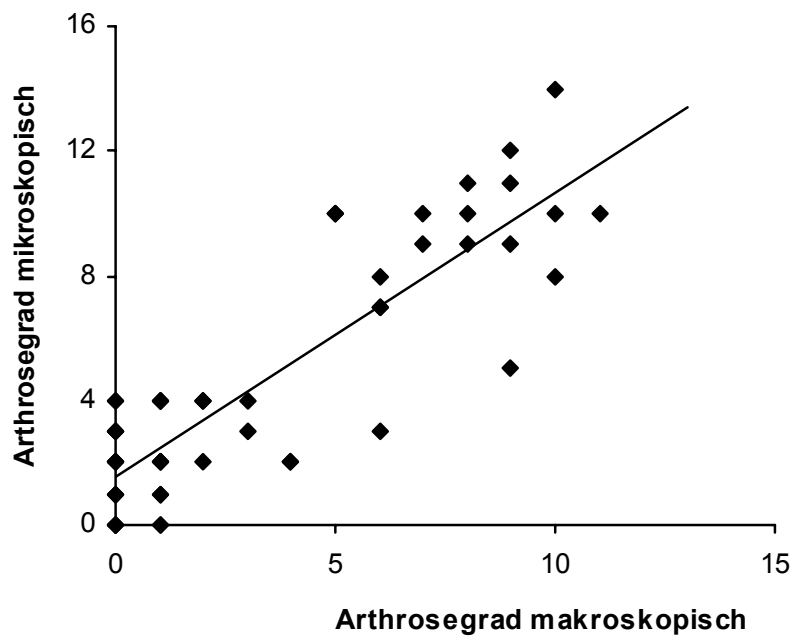
### 3.6 Histologischer Arthrosegrad

In der mikroskopischen Auswertung (mikroskopischer Score nach Mankin) zeigten sich sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Gruppe nach Kreuzbanddurchtrennung histologische Zeichen einer Arthrose. In der Gruppe der nicht operierten Tiere liegt der Mittelwert des histologischen Arthrosegrades bei  $1,75 \pm 1,581$ . Nach Scheinoperation beträgt der Mittelwert des histologischen Arthrosegrades nach 3 Wochen  $3,25 \pm 0,707$ , nach 6 Wochen  $1 \pm 1,195$  und nach 12 Wochen  $2,25 \pm 1,165$ . In der Gruppe nach Kreuzbanddurchtrennung wurden signifikant höhere histologische Arthrosegrade ermittelt ( $p < 0,01$ ). Nach 3 Wochen liegt in dieser Gruppe der Mittelwert des histologischen Arthrosegrades bei  $7,25 \pm 3,615$ , nach 6 Wochen bei  $8 \pm 2,878$  und nach 12 Wochen bei  $9,83 \pm 3,061$ . Der Mittelwert des histologischen Arthrosegrades steigt in dieser Gruppe mit der Anzahl der Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung (siehe Abbildung 18). Insgesamt wurde bei Proben mit niedrigem makroskopischem Score auch ein niedriger histologischer Arthrosegrad nachgewiesen. Bei steigendem makroskopischen Arthrosegrad erhöht sich auch der histologische Arthrosegrad. Makroskopischer und histologischer Arthrosegrad korrelierten positiv miteinander (Korrelationskoeffizient:  $0,770$ ;  $p < 0,01$ ) (siehe Abbildung 19).

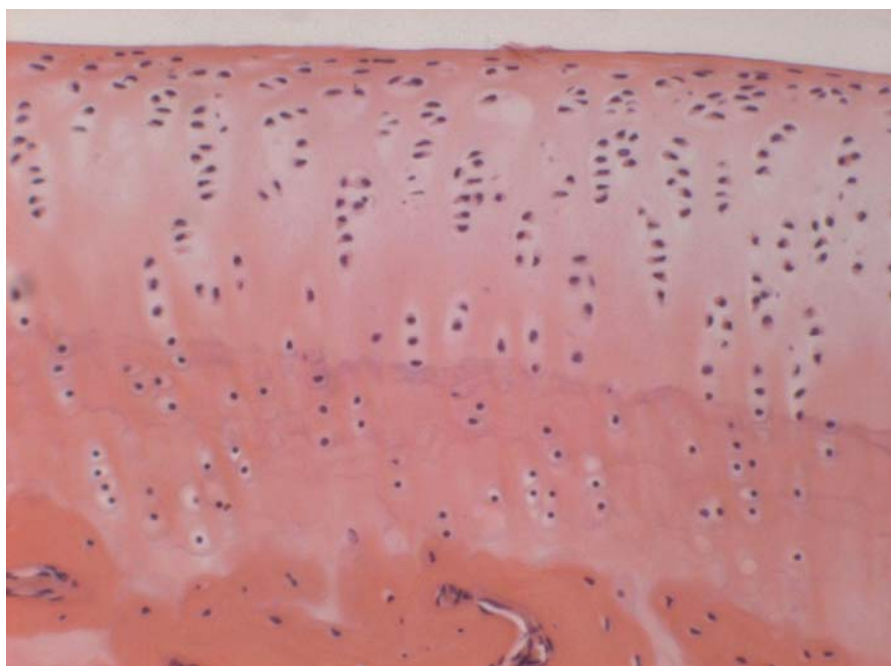


**Abbildung 18:** Vergleich histologischer Arthrosegrade bei Scheinoperation bzw. Kreuzbanddurchtrennung

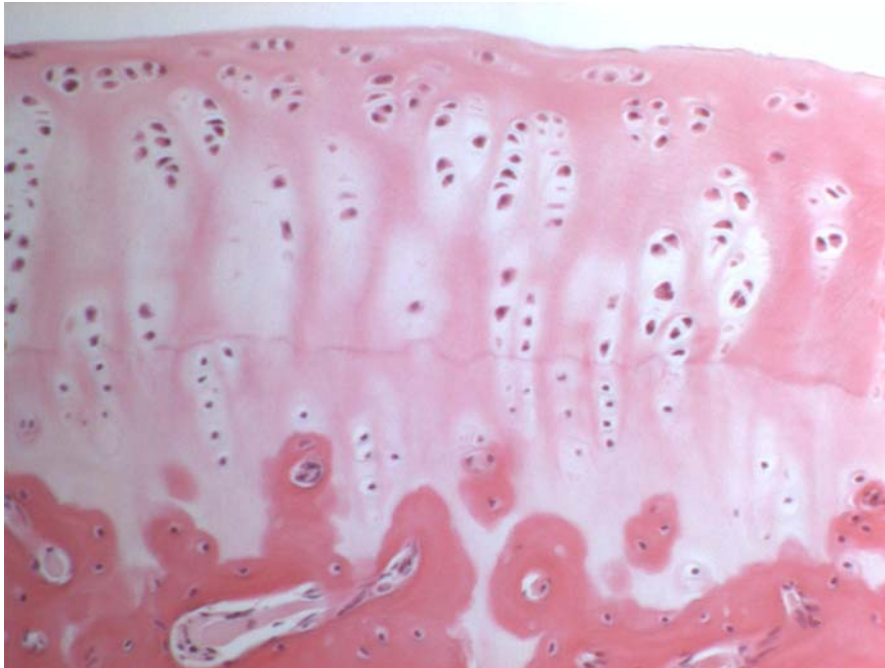




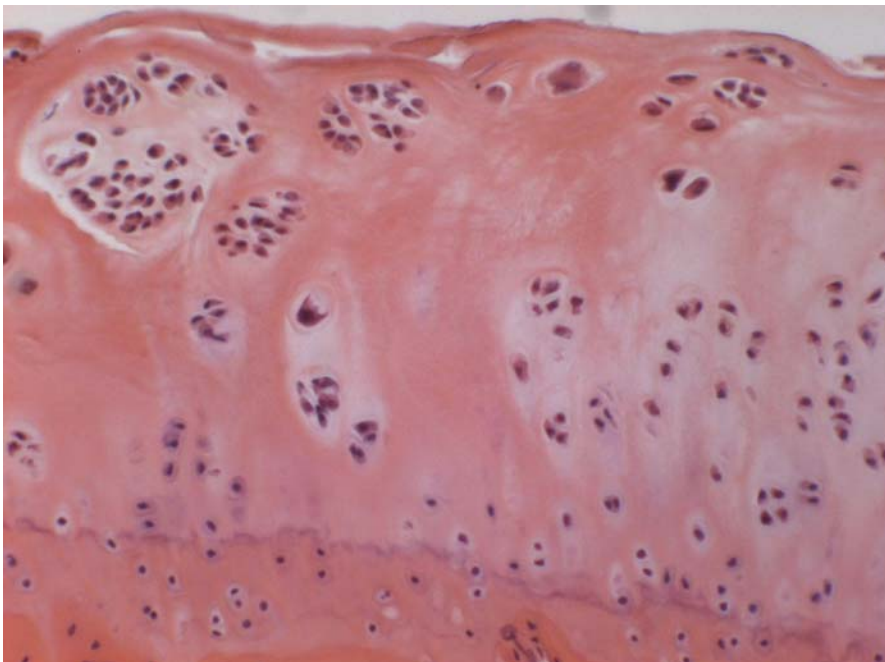
**Abbildung 19:** Korrelation mikroskopischer und makroskopischer Arthrosegrad



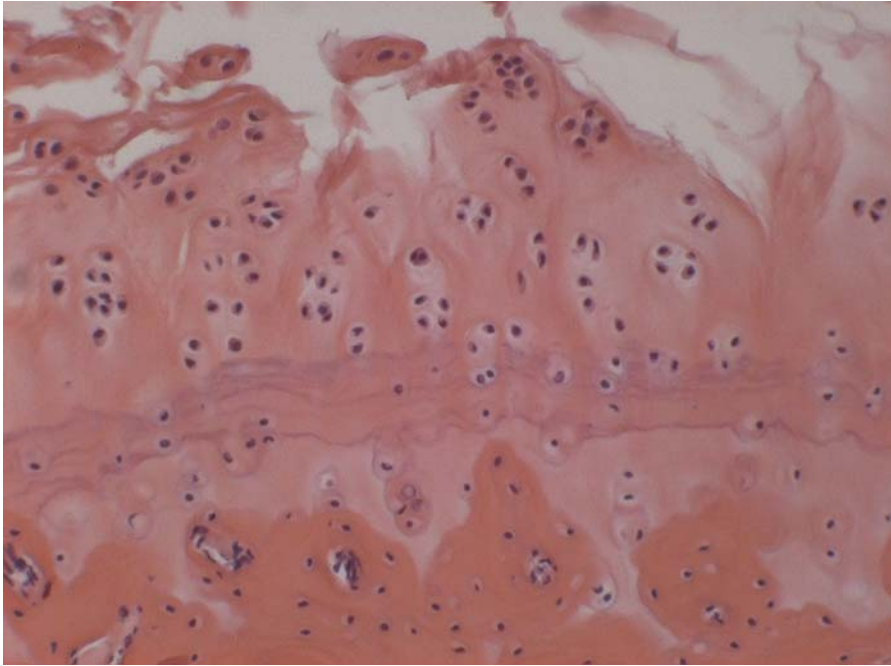
**Abbildung 20:** intakter Knorpel eines nicht operierten Kaninchens



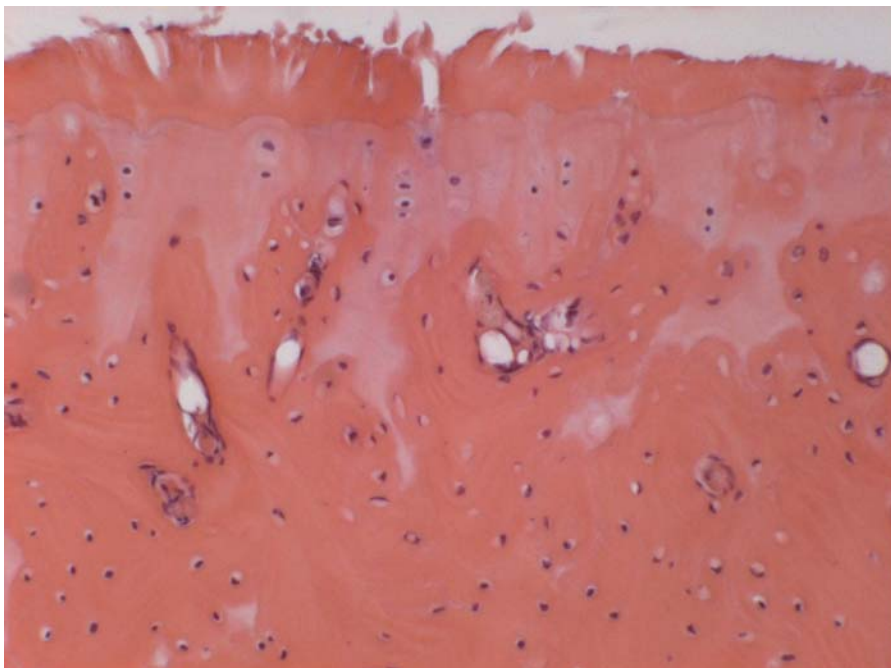
**Abbildung 21:** beginnende Störung der Knorpelarchitektur 3 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung



**Abbildung 22:** völlige Aufhebung der Knorpelarchitektur, Rissbildung und Bildung von Knorpelzell-Clustern 6 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung



**Abbildung 23:** tiefe Rissbildung und Zerstörung der Knorpeloberfläche 12 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung



**Abbildung 24:** bis auf einen schmalen Knorpelmatrixsaum vollständiger Verlust des Knorpels

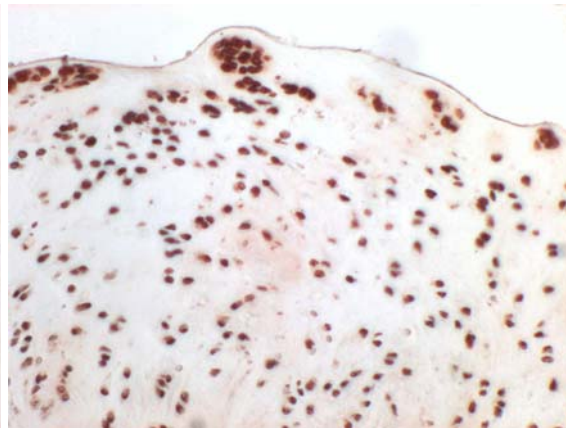
## 3.7 Immunhistochemische Färbung CD44v5 und v6

### 3.7.1 Kontrollen

Zu allen immunhistochemischen Färbungen wurden Kontrollen durchgeführt. Keine der Kontrollen zeigte eine spezifische Anfärbung von Zellen oder des Hintergrundes. Die folgenden Abbildungen zeigen jeweils eine Probe der CD44v5- und der CD44v6-Färbung und die dazugehörige Kontrolle (Abbildung 25 bis 28).



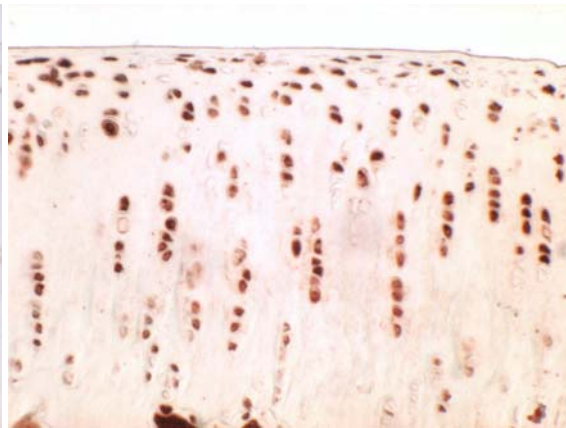
**Abbildung 25:** Kontrolle der immunhistochemischen Färbung von CD44v5



**Abbildung 26:** Immunhistochemische Anfärbung von CD44v5



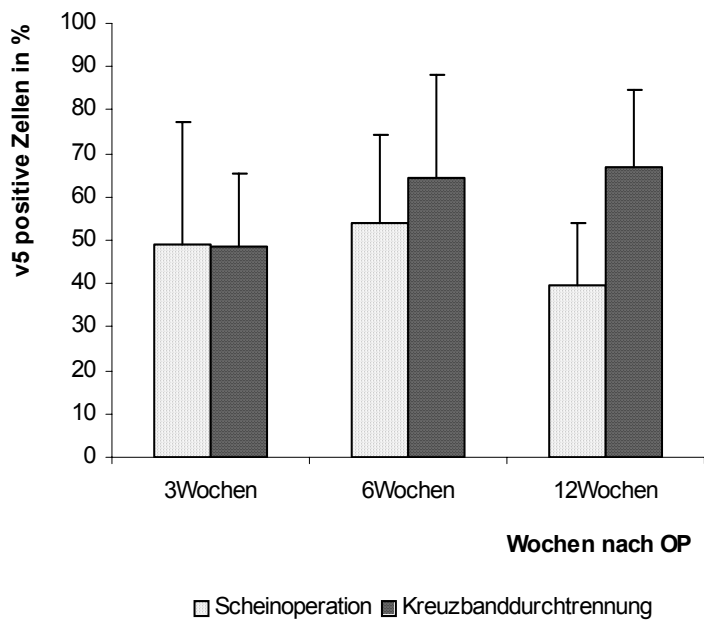
**Abbildung 27:** Kontrolle der immunhistochemischen Anfärbung von CD44v6



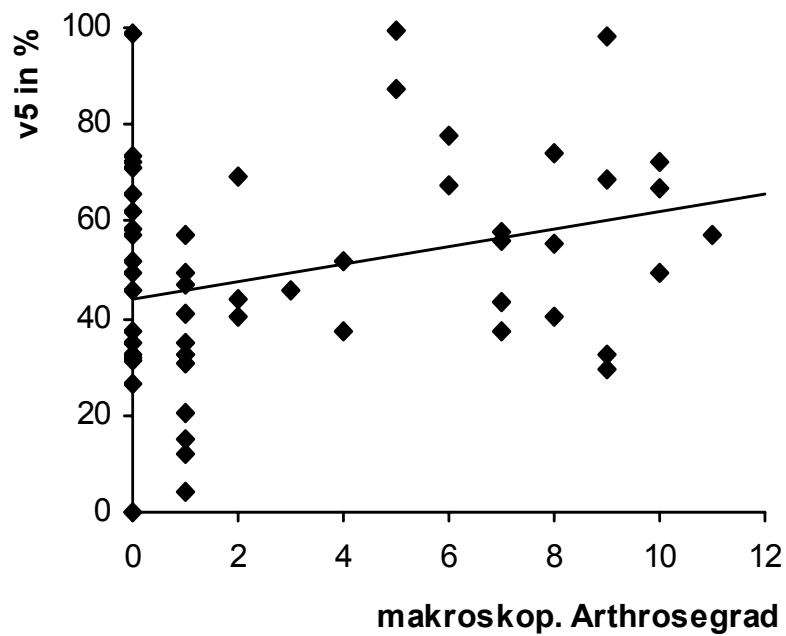
**Abbildung 28:** Immunhistochemische Anfärbung von CD44v6

### 3.7.2 CD44-v5 Rezeptornachweis

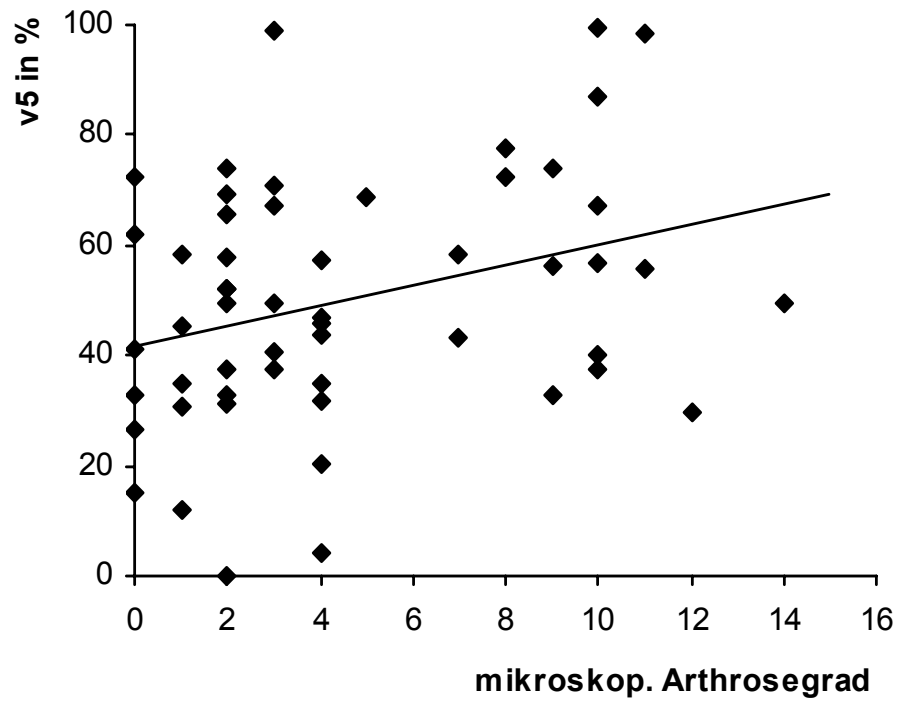
Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Versuchsgruppe lassen sich CD44v5-positive Zellen nachweisen. Nur in einer Probe aus der Gruppe der nicht operierten Tiere sind keine CD44v5-positiven Zellen nachzuweisen. Die Ergebnisse liegen zwischen 0 % und 99,52 %. In der Kontrollgruppe liegt der durchschnittliche Anteil CD44v5-positiver Zellen nach 3 Wochen bei 49,13 %, nach 6 Wochen bei 54,05 % und nach 12 Wochen bei 39,51 %. In der Gruppe nach Kreuzbanddurchtrennung sind nach 3 Wochen 48,53 %, nach 6 Wochen 64,58 % und nach 12 Wochen 66,91 % CD44v5-positive Chondrozyten nachweisbar. Nach 3 Wochen und nach 6 Wochen besteht kein signifikanter Unterschied der Mittelwerte von Kontrollgruppe und Versuchsgruppe ( $p = 0,958$  und  $p = 0,356$ ). Nach 12 Wochen ist der Unterschied der Mittelwerte von Kontrollgruppe und Versuchsgruppe signifikant ( $p < 0,05$ ). Insgesamt ist der prozentuale Anteil CD44v5-positiver Chondrozyten in der Versuchsgruppe signifikant höher ( $p < 0,05$ ) als in der Kontrollgruppe. In der Gruppe nach Kreuzbanddurchtrennung kommt es mit zunehmender Zahl der Wochen nach Operation zu einem Anstieg des Anteils CD44v5-positiver Zellen (siehe Abbildung 29). Es besteht eine positive Korrelation, die jedoch nicht signifikant ist ( $r = 0,385$ ,  $p = 0,077$ ). Es besteht eine positive Korrelation zwischen der CD44v5-Rezeptordichte und dem makroskopischen Arthrosegrad. Die Korrelation ist jedoch nicht signifikant ( $r = 0,208$ ;  $p = 0,13$ ) (siehe Abbildung 30). Insgesamt wird bei niedrigem histologischem Arthrosegrad auch ein geringerer Anteil CD44v5-positiver Zellen nachgewiesen. Mit steigendem histologischem Arthrosegrad steigt auch der Anteil der CD44v5-positiven Chondrozyten. Es besteht eine signifikante, positive Korrelation von histologischem Arthrosegrad und CD44v5-Rezeptordichte ( $r = 0,271$ ;  $p = 0,47$ ) (siehe Abbildung 31).



**Abbildung 29:** Entwicklung der CD44v5-Rezeptorexpression nach Kreuzbanddurchtrennung bzw. Scheinoperation

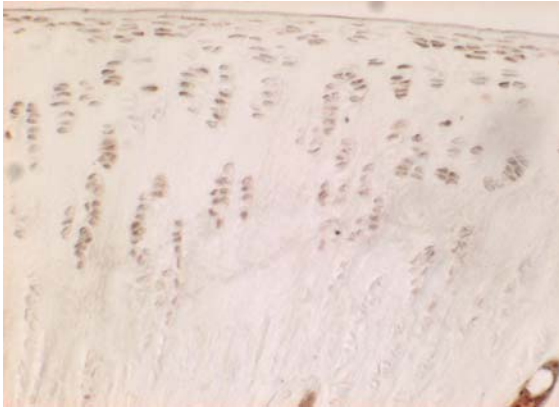


**Abbildung 30:** Korrelation von makroskopischen Arthrosegrad und CD44v5-Expression

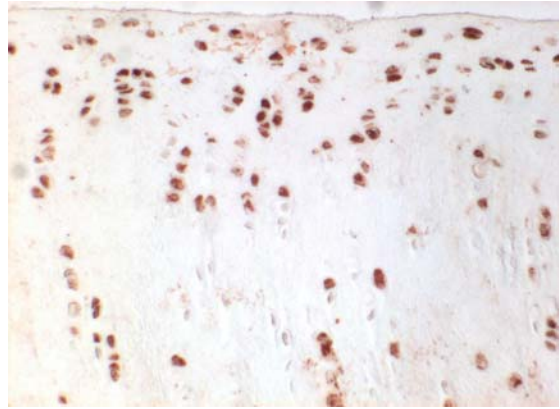


**Abbildung 31:** Korrelation von mikroskopischem Arthrosegrad und CD44v5-Expression

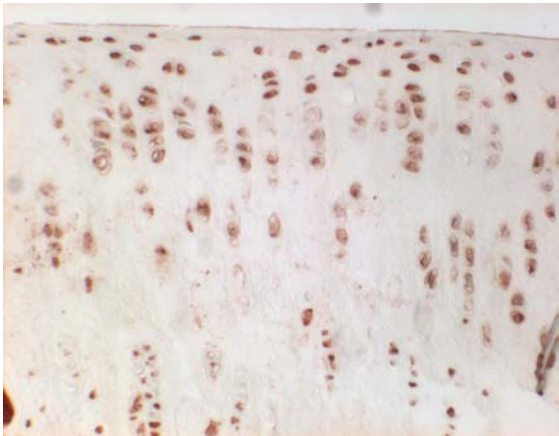




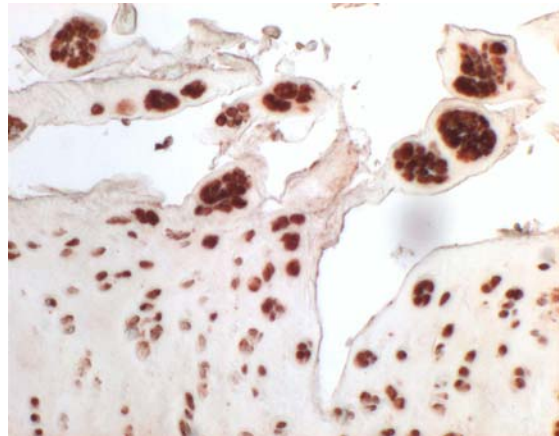
**Abbildung 32:** CD44v5 Expression 3 Wochen nach Scheinoperation



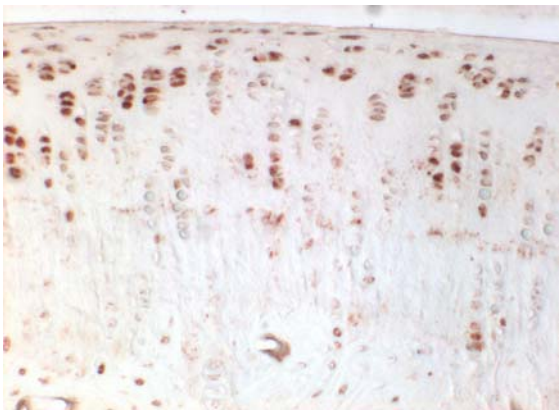
**Abbildung 33:** 3 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung



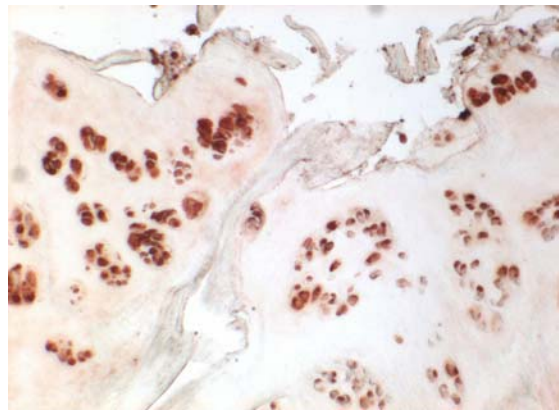
**Abbildung 34:** CD44v5 Expression 6 Wochen nach Scheinoperation



**Abbildung 35:** 6 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung



**Abbildung 36:** CD44v5 Expression 12 Wochen nach Scheinoperation

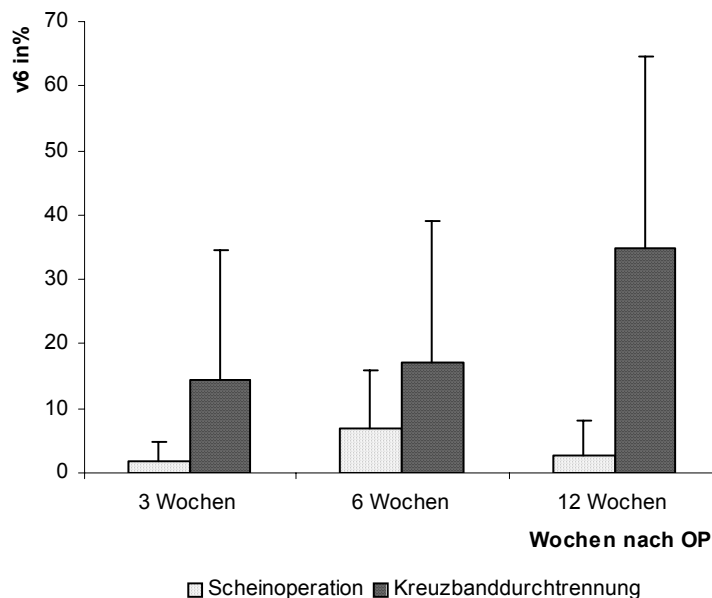


**Abbildung 37:** 12 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung



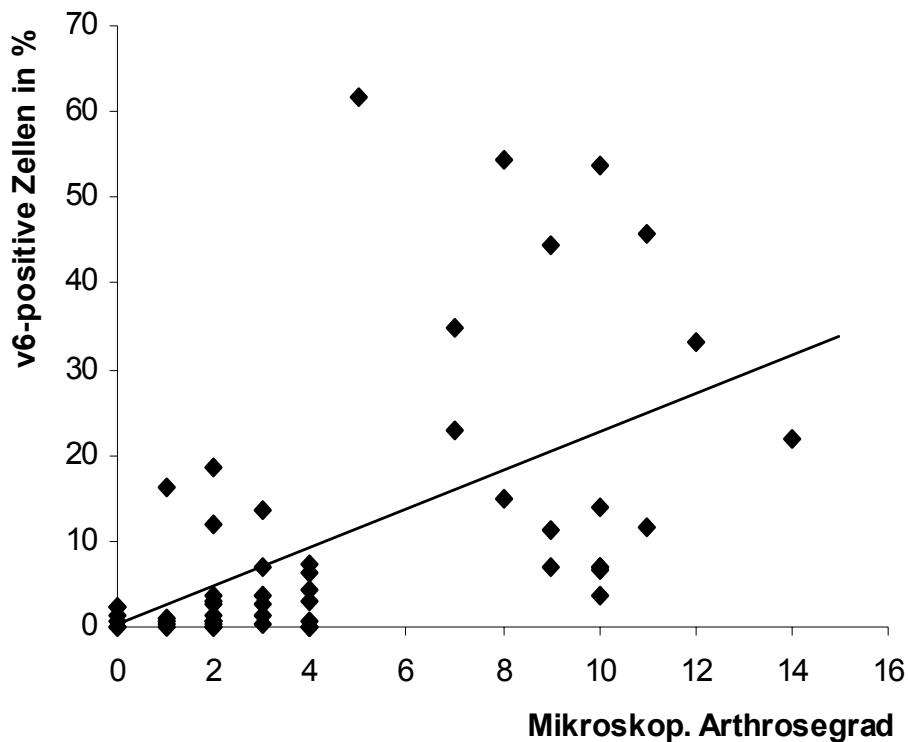
### 3.7.3 CD44-v6 Rezeptornachweis

Nach immunhistochemischer Färbung von CD44v6 und Auswertung der Färbungen mit Image-ProPlus lassen sich sowohl in der Versuchs- als auch in der Kontrollgruppe CD44v6-positive Zellen im Knorpel nachweisen. Bei 20 ausgewerteten Bildern aus der Kontrollgruppe sind keine CD44v6-positiven Zellen nachweisbar, in der Versuchsgruppe sind bei 7 ausgewerteten Bildern keine CD44v6-positiven Zellen nachweisbar. Die Ergebnisse liegen zwischen 0 % und 92,78 % CD44v6-positiver Chondrozyten. In der Kontrollgruppe liegt der Anteil CD44v6-positiver Zellen nach 3 Wochen bei durchschnittlich 1,8 %, nach 6 Wochen bei 6,99 % und nach 12 Wochen bei 2,66 %. In der Gruppe nach Kreuzbanddurchtrennung sind nach 3 Wochen 14,56 %, nach 6 Wochen 17,19 % und nach 12 Wochen 34,93 % CD44v6-positive Chondrozyten nachzuweisen (siehe Abbildung 38). Nach 3 und 12 Wochen ist der Unterschied der Mittelwerte CD44v6-positiver Zellen zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe signifikant ( $p < 0,05$ ), nach 6 Wochen sind die Mittelwerte CD44v6-positiver Zellen zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe nicht signifikant ( $p = 0,219$ ). Insgesamt ist der prozentuale Anteil CD44v6-positiver Zellen in der Kontrollgruppe signifikant niedriger als in der Versuchsgruppe ( $p < 0,05$ ).



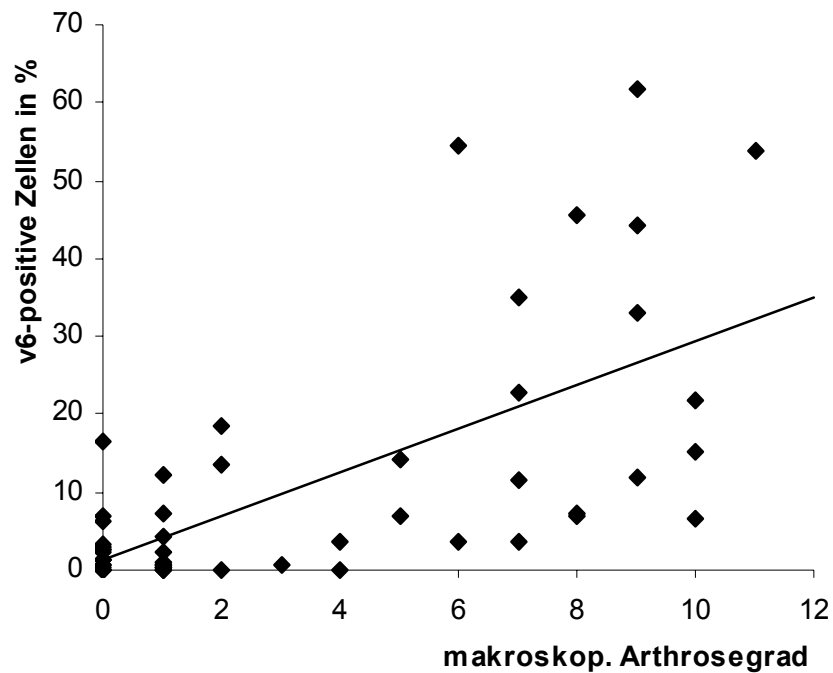
**Abbildung 38:** Entwicklung der CD44v6-Expression nach Kreuzbanddurchtrennung bzw Scheinoperation

Insgesamt wird bei einem niedrigen mikroskopischen Arthrosegrad auch ein niedriger Anteil CD44v6-positiver Zellen nachgewiesen. Mit steigendem mikroskopischen Arthrosegrad erhöht sich der prozentuale Anteil CD44v6-positiver Zellen. Es besteht eine positive Korrelation von mikroskopischen Arthrosegrad und Anteil CD44v6-positiver Chondrozyten ( $r = 0,622$ ). Die Korrelation ist signifikant ( $p < 0,05$ ) (siehe Abbildung 39).



**Abbildung 39:** Korrelation von mikroskopischem Arthrosegrad und CD44v6-Expression

Bei niedrigem makroskopischem Arthrosegrad ist auch ein niedriger Anteil CD44v6-positiver Zellen nachzuweisen. Mit steigendem makroskopischem Arthrosegrad steigt auch der prozentuale Anteil CD44v6-positiver Zellen. Es besteht eine signifikante positive Korrelation zwischen makroskopischem Arthrosegrad und dem Anteil CD44v6-positiver Chondrozyten pro Ausschnitt ( $r = 0,624$ ,  $p < 0,05$ ) (siehe Abbildung 40).



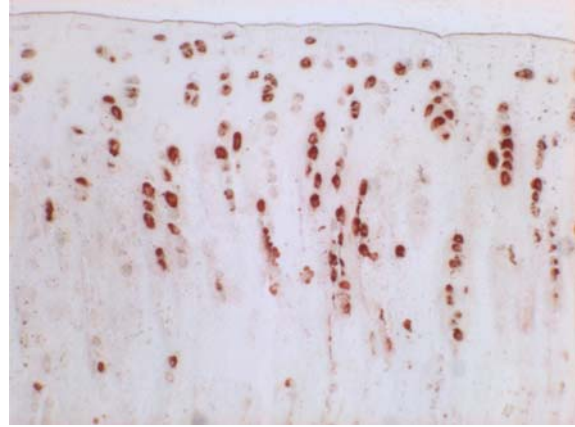
**Abbildung 40:** Korrelation von makroskopischen Arthrosegrad und CD44v6-Expression

### 3.8 Regionale CD44v5 und v6 Expression

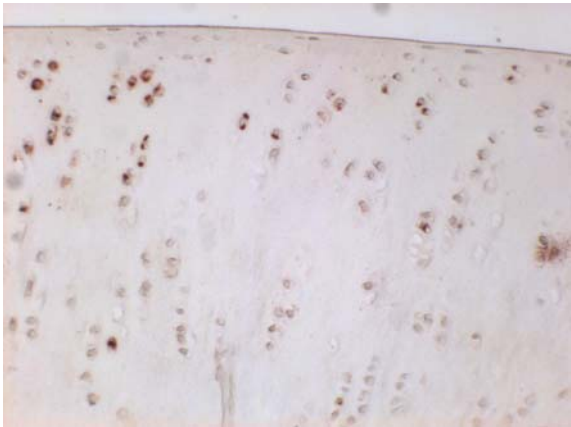
Es fiel insgesamt eine vermehrte CD44v5- und auch v6-Expression in den oberflächlichen Knorpelregionen auf. Bei zunehmender Knorpelzerstörung waren auch in tieferen Zonen CD44-positive Zellen nachweisbar. In der Safranin-O-Färbung zeigte sich der stärkste Proteoglykanverlust in den oberflächlichen Zonen des Knorpels. In vielen Proben entsprachen die Regionen des stärksten Proteoglykanverlustes den Regionen der höchsten CD44-Expression.



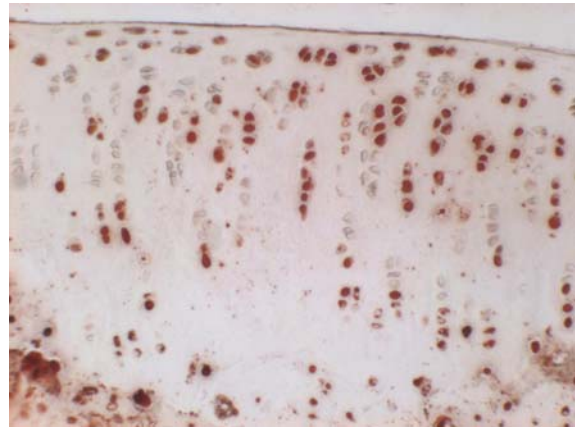
**Abbildung 41:** CD44v6 Expression 3 Wochen nach Scheinoperation



**Abbildung 42:** 3 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung



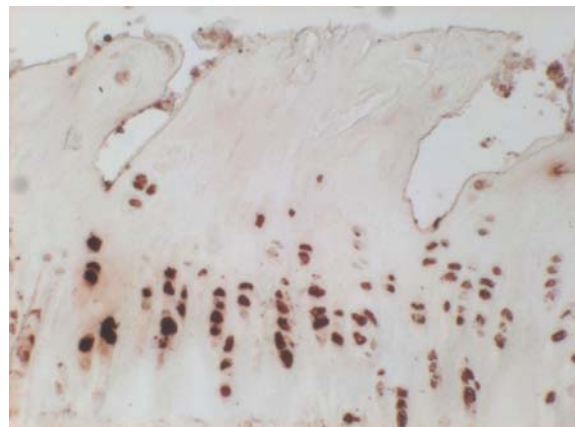
**Abbildung 43:** CD44v6 Expression 6 Wochen nach Scheinoperation



**Abbildung 44:** 6 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung



**Abbildung 45:** CD44v6 Expression 12 Wochen nach Scheinoperation



**Abbildung 46:** 12 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion der Methodik

#### 4.1.1 Tiermodellauswahl

Da die Arthrose beim Menschen normalerweise eine langsam fortschreitende Erkrankung ist und ihr Beginn häufig nicht genau festgestellt werden kann, ist die experimentell induzierte Arthrose beim Tier seit Jahren eine gängige Form, um vor allem frühe Stadien der Pathogenese der Arthrose zu untersuchen. Es wurde die Arthroseentstehung im Gelenk von Hunden [56], Mäusen [8], Schweinen [4] und Kaninchen [13] untersucht. Dabei hat sich das Neuseelandkaninchen als Modell bewährt [69]. Es ist kostengünstig in Unterbringung und Futter und liefert im Gegensatz zu Ratten oder Mäusen genug Knorpelgewebe für umfangreichere Studien.

Für die Induktion einer Arthrose im Kniegelenk des Kaninchens finden sich in der Literatur verschiedene Verfahren. Man unterscheidet chemisch induzierte und mechanisch induzierte Arthrosen. Eine chemisch induzierte Arthrose kann durch die Injektion von Papain, Zymokin, Monoiodoacetat oder Interleukin-1 $\beta$  [51], [34], [41] ins Gelenk ausgelöst werden. Allerdings bergen diese Methoden den Nachteil, dass sie einen im initialen Ausmaß unbekanntem Knorpelschaden hervorrufen und die entstehende Arthrose mit keiner Form der menschlichen Arthrose vergleichbar ist. Zudem ist der Einfluss dieser chemischen Noxen auf die geplanten biochemischen Zielvariablen nicht vorhersehbar.

Zur mechanischen Induktion einer Arthrose existiert in der Literatur eine große Zahl an Modellen. Die Bandbreite reicht von der Immobilisation [55] oder Denervierung [53] bis hin zur Destabilisierung des Gelenks [51]. Die letztgenannte Methode kommt dabei der Pathogenese im menschlichen Kniegelenk am nächsten, auch wenn sie nur den kleinen Anteil der sekundär posttraumatischen Arthrosen simuliert. Eine Destabilisierung des Kniegelenks kann wiederum durch verschiedene Methoden erreicht werden. Dazu zählen die partielle Mensektomie, die Resektion des gesamten Meniscus, beider Menisci, des vorderen Kreuzbandes, beider Kreuzbänder, die Seitenbandresektion und eine Vielzahl an Kombinationen der vorgenannten Verfahren [16], [49], [69]. Diese Verfahren unterscheiden sich deutlich in ihrem zeitlichen Verlauf und der Ausprägung der arthrotischen Veränderungen. Erfahrungsgemäß schreitet die

Arthrose nach Meniscektomie nur langsam voran und Stadien einer stark ausgeprägten Arthrose werden selten erreicht. Zudem treten die Knorpelveränderungen nur in einem eng umschriebenen Bereich auf [63]. Hulth et al. [34] haben eine Studie mit Kaninchen durchgeführt, bei der den Tieren sowohl das mediale Außenband und beide Kreuzbänder als auch der mediale Meniskus reseziert wurden. Trotz dieses ausgeprägten chirurgischen Verfahrens zeigten die Kaninchengelenke nach 12 Wochen teilweise keine Osteophyten und normal erscheinenden Gelenkknorpel. Eine mögliche Erklärung dafür könnte eine massive Entzündung im Gelenk und daraus resultierende, das Gelenk stabilisierende Kontrakturen sein. Unsere Wahl fiel auf das Modell der Durchtrennung des vorderen Kreuzbandes. Diese Form der Verletzung tritt bei Menschen häufig auf und führt abhängig von Zeit und Alter zum Auftreten einer Gonarthrose [57]. Bei diesem Modell entstehen früh arthrotische Veränderungen auf beiden Femurkondylen, die schnell progredient sind. Zudem handelt es sich um einen leicht durchführbaren, kurzen Eingriff, bei dem das Risiko starker intraartikulärer Blutungen und ausgeprägter Entzündungsprozesse minimiert werden kann [77]. Dieses Modell fand in der Arthroreforschung bereits vielfache Anwendung [69], [73], [77].

#### **4.1.2 Probenentnahme**

Im arthrotischen Knie des Menschen gibt es aufgrund verschieden starker Belastung Prädilektionsstellen für starke Knorpelschädigung. Mankin et al. [46] untersuchten 31 Areale auf 13 Femurköpfen auf histologische und biochemische Zeichen von Arthrose. Es zeigte sich dabei, dass es innerhalb eines Gelenkes, vor allem bei schon weit fortgeschrittener Arthrose, große Unterschiede im Ausmaß der arthrotischen Veränderung des Knorpels gibt. Um die Vergleichbarkeit der histologischen Beurteilung der Kaninchengelenke untereinander zu gewährleisten, sollten die Proben somit aus jeweils derselben, dieser Spezies entsprechenden Belastungszone stammen. Chang et al. [13] untersuchten 1997 die Verteilung der Knorpelschädigung nach Kreuzbanddurchtrennung im Kaninchengelenk. Sie stellten fest, dass der mediale Femurkondylus am häufigsten und ausgeprägtesten arthrotische Veränderungen aufwies. Zur Gewinnung der histologischen Schnitte entnahmen wir daher jeweils den medialen Femurkondylus.

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

### 4.2.1 Arthroseentstehung nach Kreuzbanddurchtrennung

Knorpel der Gelenke aus der Versuchsgruppe und aus der Kontrollgruppe wurde makroskopisch und histologisch untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass in der Versuchsgruppe arthrotische Veränderungen des Knorpels und des Knochens auftraten und mit der Zeit progredient waren. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie entsprachen dabei den Ergebnissen vorangegangener Studien [73], [77]. Die Kreuzbanddurchtrennung führte zu schnell progredienten arthrotischen Veränderungen. Nach 3 Wochen war in 6 von 8 Gelenken eine deutliche Arthrose nachweisbar. Nach 12 Wochen zeigten alle Gelenke fokale Knorpelverluste bis auf den Knochen. Es war ein mit der Zeit zunehmender Verlust von Proteoglykanen, eine Bildung von Osteophyten und Veränderungen der Chondrozyten nachweisbar, die den Angaben vorangegangener Studien entsprechen und mit den Veränderungen bei der Arthrose des Menschen vergleichbar sind.

Die Kontrollgruppe und die Gruppe der nicht operierten Tiere zeigten im Gegensatz dazu Gelenke mit makroskopisch und histologisch geringen Anzeichen einer Arthrose, die mit steigender Wochenzahl nach Scheinoperation nicht progredient waren. Die durchschnittlichen Werte der Arthrosegrade der Gruppe der nicht operierten Tiere entsprachen etwa denen der Kontrollgruppe. Damit konnte eine Beeinflussung der Arthroseentstehung durch die Eröffnung des Kniegelenks ausgeschlossen werden. Die Anzeichen von Arthrose, die an wenigen Gelenken der Kontrollgruppe beobachtet wurden, entsprechen somit am ehesten spontan aufgetretenen degenerativen Veränderungen. Die Unterschiede der degenerativen Veränderungen in den Gelenken der Tiere der Kontrollgruppe und in der Gruppe der nicht operierten Tiere waren klein. Über 50% der Gelenke nach Scheinoperation zeigten keine histologischen Anzeichen einer Arthrose und in keinem Fall wurde ein Arthrosegrad (Score nach Mankin et al.) über 4 erhoben.

Die Varianz in der Versuchsgruppe war dagegen hoch. Es traten schon nach 3 Wochen in einigen Gelenken hohe Arthrosegrade auf, während in der Gruppe nach 12 Wochen auch Gelenke mit relativ niedrigem Arthrosegrad beobachtet wurden. Diese deutlichen Unterschiede im Arthrosegrad bei Tieren, die zur selben Zeit nach Operation getötet wurden, beschreiben auch Vignon et al. in einer Studie am Kaninchenmodell [73]. Für diese Ergebnisse gibt es mehrere Erklärungsmodelle. Zum einen gibt es deutliche interindividuelle Unterschiede in Bezug auf die postoperative

Gewichtszunahme und auf das Ausmaß der Bewegung und Belastung der operierten Kniee. Zudem nimmt man beim Menschen eine genetisch bedingte unterschiedliche Disposition zur Erkrankung an einer Arthrose an, die auch beim Kaninchen vorhanden sein könnte. Des Weiteren beobachteten Mankin et al. [46] bei der Untersuchung verschiedener Areale eines arthrotischen Femurkopfes große Unterschiede im Ausmaß der arthrotischen Veränderungen. Diese Tatsache könnte bei der Entnahme nur eines Areals zu einer größeren Varianz der Ergebnisse führen. Um auszuschließen eine nicht oder wenig repräsentative Probe zur histologischen Beurteilung gewonnen zu haben, bestimmten wir den Korrelationskoeffizient von makroskopischen und mikroskopischen Arthrosegraden. Es besteht eine signifikante, positive Korrelation zwischen makroskopischem und mikroskopischem Arthrosegrad. Dies erlaubt uns, das Ergebnis der histologischen Auswertung einer Probe als repräsentativ für den Zustand des Gelenkes anzunehmen.

#### **4.2.2 CD44-v5 und v6**

Die vorliegende Studie untersucht erstmals die Expression der CD44-Isoformen v5 und v6 in einer experimentell induzierten Arthrose im Kaninchengelenk. Vorangegangene Studien haben erhöhte Spiegel von CD44v5 in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis nachgewiesen, die mit der entzündlichen Aktivität der Krankheit assoziiert sind [28], [30]. Dies lässt eine Beteiligung dieser CD44-Isoform in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis vermuten. Fuchs et al. wiesen eine erhöhte Expression von CD44v5 in Knorpel und Synovia von Patienten im Endstadium der Gonarthrose nach [22]. Die Beteiligung von CD44v5 im Frühstadium der Arthrose ist noch weitgehend unklar. CD44v6 konnte bisher in Synovialzellen von Patienten mit rheumatoider Arthritis und in Synovialzellen von Arthrosepatienten nachgewiesen werden [17]. Zur Expression von CD44v6 im normalen oder arthrotischen Knorpel gibt es bisher noch keine Arbeiten.

In den immunhistochemischen Färbungen für CD44v5 und CD44v6 der vorliegenden Studie zeigten sich eine kräftige Anfärbung von Zellmembran und eine meist etwas schwächere Färbung des Zellinneren von Chondrozyten. In den meisten Proben waren sowohl CD44-positive als auch CD44-negative Chondrozyten nachweisbar. Diese



Färbeergebnisse entsprechen den Färbeergebnissen und histologischen Bildern vorangegangener Studien mit Färbungen von CD44H [54], [58].

In dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass sowohl in gesundem als auch im arthrotischen Knorpel CD44v5 exprimiert wird. Nur in einer Probe war CD44v5 nicht nachweisbar. Dies spricht dafür, dass CD44v5 sowohl an den physiologischen Vorgängen im Knorpel als auch an den Stoffwechselfvorgängen im Laufe der Entstehung einer Arthrose beteiligt ist. Es zeigt sich eine unterschiedliche CD44v5-Expression im Vergleich von Kontroll- und Versuchsgruppe. Zu den frühen Zeitpunkten von 3 und 6 Wochen ist der Unterschied noch nicht signifikant, erst nach 12 Wochen besteht ein signifikanter Unterschied von Kontroll- und Versuchsgruppe. Dies lässt vermuten, dass es erst in den späteren Stadien der Arthrose zu einer vermehrten Expression von CD44v5 im arthrotischen Knorpel kommt.

Es konnte weiterhin eine signifikante Korrelation zwischen histologischen Arthrosegrad nach Mankin und CD44v5-Expression festgestellt werden. Damit zeigte sich eine enge Assoziation der histomorphologischen Veränderungen im arthrotischen Knorpel mit der CD44v5-Expression. CD44v5 stellt somit einen möglichen Marker der degenerativen Veränderungen des Knorpels dar. Die Korrelation der CD44v5-Dichte zu der Wochenzahl nach Operation und zum makroskopischen Score ist dagegen nicht signifikant. Diese fehlende Korrelation könnte durch die interindividuell verschieden starke Arthroseentstehung und die schon von Mankin [46] beschriebene große Varianz der histologischen Veränderungen innerhalb eines Gelenkes bedingt sein. Somit ist es auch möglich, dass innerhalb eines Gelenkes die regionale CD44v5-Expression stark variiert. In einer Untersuchung von Femurköpfen im Endstadium der Arthrose konnte eine regional unterschiedliche Expression von CD44H allerdings nicht nachgewiesen werden [54]. Unsere Ergebnisse legen einen solchen regionalen Unterschied in der CD44-Expression jedoch nahe, da schon innerhalb der von uns gewonnenen einzelnen Probe regionale Unterschiede in der CD44-Expression auffielen.

Die vorliegende Studie konnte nachweisen, dass Chondrozyten aus gesundem Knorpel im Gegensatz zu CD44v5 nicht oder nur in geringem Prozentsatz CD44v6 exprimieren. Es zeigte sich im Laufe der Entwicklung einer experimentellen Arthrose im Kaninchengelenk eine signifikante Erhöhung des Anteils an Chondrozyten, die CD44v6-Rezeptoren exprimieren. Dabei korrelierte der Anteil CD44v6-positiver Zellen signifikant mit dem von uns makroskopisch und histologisch bestimmten Ausmaß der Knorpelzerstörung, nicht jedoch mit der Anzahl der Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung. CD44v6 scheint somit im physiologischen Metabolismus des

gesunden Knorpels keine wesentliche Rolle zu spielen. Die Erhöhung von CD44v6 auf Chondrozyten bei zunehmender Arthrose spricht für eine Beteiligung dieser Rezeptor-Isoform in der Pathogenese der Arthrose. Auf Tumorzellen wurde ein Zusammenhang von vermehrter CD44v6-Expression auf der Zelloberfläche und einer vermehrten Bindungskapazität für Hyaluronsäure nachgewiesen. Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch bei Chondrozyten denkbar [65].

Vorangegangene Studien zeigten bereits einen Zusammenhang zwischen Knorpelzerstörung und CD44-Expression. Salter et al. [58] wiesen CD44H sowohl in gesundem als auch im arthrotischen menschlichen Knorpel nach. Zusätzlich waren verschiedene andere CD44-Isoformen in geringeren Mengen nachweisbar. 1997 wiesen Ostergaard et al. [54] CD44H sowohl in gesundem als auch in arthrotischen menschlichen Femurköpfen nach. Sie konnten ausschließlich in der tiefen Zone des Knorpels einen signifikanten Unterschied zwischen gesundem und arthrotischen Knorpel nachweisen. In beiden Studien wurden die Knorpelproben aus Gelenken gewonnen, die zum Zeitpunkt des Gelenkersatzes entnommen wurden. Sie untersuchten somit die Expression von CD44 im Knorpel aus Gelenken im Endstadium der Arthrose. Über die Expression von CD44 in den frühen Stadien einer Arthrose und damit über eine mögliche Rolle bei der Entstehung der Arthrose war folglich keine Aussage möglich. Nishida et al. [52] zeigten 2000, dass eine Behandlung von menschlichen Chondrozyten mit IL-1, einem wichtigen destruierenden Faktor in der Pathogenese der Arthrose, zu einer um das dreifache erhöhten Expression von CD44-mRNA führte. Im Übrigen waren typische Merkmale einer Arthrose - wie die verminderte Synthese von Aggrecan, der Verlust von Hyaluronsäure in der extrazellulären Matrix und eine intrazelluläre Ansammlung von Hyaluronsäure - nachweisbar. Ähnliche Ergebnisse erhielten Chow et al. [14]. Mit Interleukin-1 behandelte Rinderchondrozyten zeigten einen sechsfachen Anstieg der CD44-mRNA, mit Fibronektinfragmenten behandelte Chondrozyten sogar einen Anstieg um das Achtfache. Eine erhöhte Bindung der Chondrozyten an Hyaluronsäure ließ den Schluss zu, dass auch die Anzahl aktiver CD44-Rezeptoren an der Zelloberfläche erhöht ist. Die Problematik dieser Ergebnisse liegt in der starken Vereinfachung der Vorgänge bei der Arthrose, da nur ein einzelner Faktor aus der komplexen Pathogenese der Arthrose zu den Veränderungen der CD44-Expression führte. Somit ist eine Vergleichbarkeit zu den frühen Veränderungen im menschlichen Knorpel bei der Arthroseentstehung nur bedingt möglich.

Unsere Ergebnisse zeigen die Veränderungen in der Expression zweier Isoformen des CD44-Rezeptors in einem Tiermodell, das in seiner Pathogenese einem Teil der im menschlichen Gelenk vorkommenden Arthrosen entspricht.

Grundsätzlich kann es sich bei der vermehrten Expression von CD44v5 und v6 um eine ursächliche Veränderung oder um einen Gegenregulationsmechanismus des schon angegriffenen Knorpels handeln. Knudson et al. [38] konnten 1993 nachweisen, dass die extrazelluläre Matrix über die Bindung von Hyaluronsäure an den CD44-Rezeptor an den Chondrozyten verankert ist. Kompetitive Hemmung von CD44 mit Hyaluronsäurefragmenten führte zu einer Auflösung der perizellulären Matrix der Chondrozyten. Eine Neubildung von extrazellulärer Matrix nach Entfernung mit Hyaluronidase konnte durch kompetitive Hemmung des CD44-Rezeptors verhindert werden. Bei fehlender CD44-Expression bildeten die Chondrozyten ebenfalls keine perizelluläre Matrix. CD44 spielt somit sowohl bei der Bildung als auch bei der Verankerung der extrazellulären Matrix und der Interaktion des Chondrozyten mit seiner Matrix eine wesentliche Rolle. Chow et al. [15] hemmten die CD44-Expression von Rinderchondrozyten auf der Ebene der Transkription. Nach der Behandlung zeigte sich in allen Schnitten ein massiver Proteoglykanverlust. Der Nachweis einer deutlichen Erhöhung von Aggrekanfragmenten bestätigte, dass es sich bei diesen Veränderungen nicht um eine passive Abdiffusion der nicht mehr verankerten Matrix, sondern um eine aktive Reaktion der Chondrozyten durch enzymatischen Abbau handelt. Auch Knudson et al. [40] wiesen einen Proteoglykanverlust in Knorpelkulturen nach Behandlung mit Hyaluronsäurefragmenten nach. Zusätzlich zeigten sie, dass die mRNA sowohl kataboler als auch anaboler Enzyme durch die kompetitive Hemmung des CD44-Rezeptors erhöht wird. Dies ähnelt den bei Arthrose nachgewiesenen metabolischen Vorgängen. Die Ergebnisse legen nahe, dass der Chondrozyt über die Bindung von Hyaluronsäure an CD44 Veränderungen in der extrazellulären Matrix wahrnimmt und darauf reagiert. Eine verminderte Bindung von Hyaluronsäure an CD44 im Rahmen des Matrixverlustes bei der Arthrose könnte somit zu weiteren katabolen Reaktionen der Chondrozyten und im Sinne einer Gegenregulation des Knorpels zu einer Hochregulation des CD44-Rezeptors führen. In einem Modell einer durch Injektion von Kollagen induzierten rheumatoiden Arthritis bei Mäusen konnte eine mit zunehmender Destruktion des Knorpels vermehrte CD44-Expression der Chondrozyten nachgewiesen werden [60]. Eine erhöhte Expression von CD44 scheint somit eine Reaktion der Chondrozyten auf eine Zerstörung der extrazellulären Matrix zu sein, die unabhängig von der initialen Ursache der Knorpelschädigung ist.

Es war in vielen Proben der vorliegenden Studie eine verstärkte Färbung von v5 und v6 in den oberflächlichen Zonen nachweisbar, die in der Safranin-O-Färbung auch den stärksten Proteoglykanverlust zeigten. In einer Studie von Nishida et al. [52] wurde durch die Behandlung von normalen menschlichen Knorpel und isolierten Chondrozyten mit IL-1 ein Proteoglykanverlust vor allem in den oberflächlichen Zonen des Knorpels ausgelöst. In den Zonen des stärksten Proteoglykanverlustes ließ sich eine stark erhöhte Expression von CD44 nachweisen, die den Ergebnissen der vorliegenden Studie entspricht. Auch Chow et al. [14] wiesen bei mit IL-1 behandelten menschlichen Chondrozyten einen erhöhten Gehalt von CD44mRNA in den oberflächlichen Zonen des Knorpels nach. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der einzelne Chondrozyt Veränderungen der ihn umgebenden extrazellulären Matrix wahrnehmen kann und mit einer Veränderung seiner CD44-Expression reagiert. Knudson et al. [37] konnten nachweisen, dass bei Entfernung der perizellulären Matrix die intrazelluläre Domäne des CD44-Rezeptors dephosphoriliert und nach Zugabe von Hyaluronsäure wieder rephosphoriliert wird. Dieser Vorgang könnte ein mögliches Signal für den Chondrozyten sein, das es ihm ermöglicht auf Veränderungen seiner extrazellulären Matrix zu reagieren.

Eine andere Erklärung der gesteigerten CD44-Expression wäre eine durch Interleukine oder andere Mediatoren verursachte Veränderung des Phänotyps der Chondrozyten, eine dadurch erhöhte CD44-Expression und konsekutiv ein erhöhter Abbau der extrazellulären Matrix. Es wurde nachgewiesen, dass Hyaluronsäure mittels CD44 über Endozytose in die Zelle aufgenommen und dort abgebaut wird [32]. Chow et al. [14] wiesen in den mit IL-1 behandelten Zellen größere Mengen von Hyaluronsäure-Spaltprodukten nach. In einer weiteren Studie wurde nach Behandlung von Knorpel mit IL-1 sowohl eine 3-fach erhöhte CD44mRNA als auch erniedrigte extrazelluläre und erhöhte intrazelluläre Hyaluronsäure gemessen [52]. Aguiar et al. [1] konnten nachweisen, dass Aufnahme und Abbau von Hyaluronsäure mittels Endozytose des CD44-Rezeptors abhängig von der Bindung an Hyaluronsäure und damit an die extrazelluläre Matrix ist. Auf unbehandelten Chondrozyten betrug die Internalisation 6% der CD44-Moleküle an der Zelloberfläche in 4 Stunden. Nach Entfernung der perizellulären Matrix mittels Hyaluronidasen stieg diese auf 20% an und konnte mittels Zugabe von Hyaluronsäure wieder gesenkt werden. Aguiar et al. vermuten, dass eine Bindung an die extrazelluläre Matrix das CD44-Molekül an der Zelloberfläche stabilisiert und so zu einer geringeren Internalisation und damit zu einem geringeren Abbau von Hyaluronsäure führt. Die erhöhte CD44-Expression und die gleichzeitig

geringere Bindung an die extrazelluläre Matrix könnte somit zu einer erhöhten Endozytose und damit zu einem erhöhten Abbau von Hyaluronsäure führen. Damit wäre die erhöhte CD44-Expression Ursache einer vermehrten Degradation der extrazellulären Matrix und damit eines wesentlichen Schrittes in der Pathogenese der Arthrose.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Studie einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Expression der CD44-Isoformen v5 und v6 und arthrotischen Veränderungen im Knorpel. Sie sprechen für eine Beteiligung dieser Isoformen in der Pathogenese der Arthrose. Weitere Studien sind nötig, um die Funktion dieser Isoformen im gesunden Knorpel und in den pathophysiologischen Vorgängen im arthrotischen Knorpel zu klären.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Aguiar DJ, Knudson W, Knudson CB (1999): Internalization of the hyaluronan receptor CD44 by chondrocytes. *Exp Cell Res* 252 (2): 292-302.
2. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B (1990): CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61 (7): 1303-1313.
3. Bajorath J (2000): Molecular organization, structural features, and ligand binding characteristics of CD44, a highly variable cell surface glycoprotein with multiple functions. *Proteins* 39 (2): 103-111.
4. Bendele AM (1987): Progressive chronic osteoarthritis in femorotibial joints of partial medial meniscectomized guinea pigs. *Vet Pathol* 24 (5): 444-448.
5. Bennett KL, Jackson DG, Simon JC, Tanczos E, Peach R, Modrell B, Stamenkovic I, Plowman G, Aruffo A (1995): CD44 isoforms containing exon V3 are responsible for the presentation of heparin-binding growth factor. *J Cell Biol* 128 (4): 687-698.
6. Bennett KL, Modrell B, Greenfield B, Bartolazzi A, Stamenkovic I, Peach R, Jackson DG, Spring F, Aruffo A (1995): Regulation of CD44 binding to hyaluronan by glycosylation of variably spliced exons. *J Cell Biol* 131 (6 Pt 1): 1623-1633.
7. Berg Wvd (1999): The role of cytokines and growth factors in cartilage destruction in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol* 58: 136-141
8. Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR (1977): Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum* 20 (3): 841-850.
9. Brandt KD (1991): The pathogenesis of osteoarthritis. *Rheumatology Review* 1: 3-11
10. Bucher O, Wartenberg H (1997) *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. Verlag Hans Huber, 12. vollständig überarbeitete Auflage, S. 126-128
11. Carter W, Wayner E (1998): Characterization of the class III collagen receptor, a phosphorylated , transmembrane glykoprotein expressed in nucleated human cells. *J Biol Chem* 263: 4193-4201
12. Catterall J, Gardner M, Turner G (1995): Hyaluronic acid, cell adhesion and metastasis. *The Cancer Journal* 8: 320-324
13. 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.

14. Chow G, Knudson CB, Homandberg G, Knudson W (1995): Increased expression of CD44 in bovine articular chondrocytes by catabolic cellular mediators. *J Biol Chem* 270 (46): 27734-27741.
15. Chow G, Nietfeld JJ, Knudson CB, Knudson W (1998): Antisense inhibition of chondrocyte CD44 expression leading to cartilage chondrolysis. *Arthritis Rheum* 41 (8): 1411-1419.
16. Colombo C, Butler M, O'Byrne E, Hickman L, Swartzendruber D, Selwyn M, Steinetz 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. *Arthritis Rheum* 26 (7): 875-886.
17. Croft DR, Dall P, Davies D, Jackson DG, McIntyre P, Kramer IM (1997): Complex CD44 splicing combinations in synovial fibroblasts from arthritic joints. *Eur J Immunol* 27 (7): 1680-1684.
18. Dalchau R, Kirkley J, Fabre JW (1980): Monoclonal antibody to a human leukocyte-specific membrane glycoprotein probably homologous to the leukocyte-common (L-C) antigen of the rat. *Eur J Immunol* 10 (10): 737-744.
19. DeGrendele HC, Estess P, Picker LJ, Siegelman MH (1996): CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: a novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway. *J Exp Med* 183 (3): 1119-1130.
20. Erggelet C, Steinwachs M (2001) Gelenkknorpeldefekte. Steinkopffverlag, Darmstadt, S.167-181.
21. Fergusson CM (1987): The aetiology of osteoarthritis. *Postgrad Med J* 63: 439-445
22. Fuchs S, Dankbar B, Wildenau G, Goetz W, Lohmann C, Tibesku CO (2003): Correlation of radiographical, histomorphical and immunohistochemical parameters in the human osteoarthritic knee joint. Im Druck
23. Garcia F (1999): Catabolic events in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 7: 308-309
24. Goldstein LA, Butcher EC (1990): Identification of mRNA that encodes an alternative form of H-CAM(CD44) in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Immunogenetics* 32 (6): 389-397
25. Green SJ, Tarone G, Underhill CB (1988): Aggregation of macrophages and fibroblasts is inhibited by a monoclonal antibody to the hyaluronate receptor. *Exp Cell Res* 178 (2): 224-232.

26. Gunthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zoller M, Haussmann I, Matzku S, Wenzel A, Ponta H, Herrlich P (1991): A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 65 (1): 13-24.
27. Guo Y, Ma J, Wang J, al. e (1994): Inhibition of human melanoma growth and metastasis in vivo by anti-CD44 monoclonal antibody. *Cancer Res* 54: 1561-1565
28. Hale LP, Haynes BF, McCachren SS (1995): Expression of CD44 variants in human inflammatory synovitis. *J Clin Immunol* 15 (6): 300-311.
29. Hardingham TE, Fosang AJ (1992): Proteoglycans: many forms and many functions. *Faseb J* 6 (3): 861-870.
30. Haynes BF, Hale LP, Patton KL, Martin ME, McCallum RM (1991): Measurement of an adhesion molecule as an indicator of inflammatory disease activity. Up-regulation of the receptor for hyaluronate (CD44) in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 34 (11): 1434-1443.
31. Hofmann M, Rudy W, Gunthert U, Zimmer SG, Zawadzki V, Zoller M, Lichtner RB, Herrlich P, Ponta H (1993): A link between ras and metastatic behavior of tumor cells: ras induces CD44 promoter activity and leads to low-level expression of metastasis-specific variants of CD44 in CREF cells. *Cancer Res* 53 (7): 1516-1521.
32. Hua Q, Knudson CB, Knudson W (1993): Internalization of hyaluronan by chondrocytes occurs via receptor-mediated endocytosis. *J Cell Sci* 106 (Pt 1): 365-375.
33. Hudson DL, Speight PM, Watt FM (1996): Altered expression of CD44 isoforms in squamous-cell carcinomas and cell lines derived from them. *Int J Cancer* 66 (4): 457-463.
34. Hulth A, Lindberg L, Telhag H (1970): Experimental osteoarthritis in rabbits. Preliminary report. *Acta Orthop Scand* 41 (5): 522-530
35. Jalkanen S, Jalkanen M (1992): Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J Cell Biol* 116 (3): 817-825.
36. Joosten LA, Helsen MM, van de Loo FA, van den Berg WB (1996): Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. A comparative study using anti-TNF alpha, anti- IL-1 alpha/beta, and IL-1Ra. *Arthritis Rheum* 39 (5): 797-809.
37. Knudson C, Constable C, Nofal G (1997): Changes in phosphorylation and actin-association of CD44 with receptor occupancy on articular chondrocytes. *Orthop Trans* 22: 34



38. Knudson CB (1993): Hyaluronan receptor-directed assembly of chondrocyte pericellular matrix. *J Cell Biol* 120 (3): 825-834.
39. Knudson CB, Knudson W (1993): Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis, and disease. *Faseb J* 7 (13): 1233-1241.
40. Knudson W, Casey B, Nishida Y, Eger W, Kuettner KE, Knudson CB (2000): Hyaluronan oligosaccharides perturb cartilage matrix homeostasis and induce chondrocytic chondrolysis. *Arthritis Rheum* 43 (5): 1165-1174.
41. 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 biochemically induced osteoarthritic rabbit knee cartilages. *Jpn J Physiol* 47 (3): 291-297.
42. Leonhardt H (1990) *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*. Thieme Verlag, S.134-137.
43. Lesley J, Hyman R, Kincade PW (1993): CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol* 54: 271-335
44. Loo Fvd, Kuiper S, Enckevort Fv, Arntz O, Berg Wvd (1997): IL-6 reduces cartilage destruction during experimental arthritis. A study in IL-6 deficient mice. *Am J Pathol* 151: 177-191
45. Mackay CR, Maddox JF, Wijffels GL, Mackay IR, Walker ID (1988): Characterization of a 95,000 molecule on sheep leucocytes homologous to murine Pgp-1 and human CD44. *Immunology* 65 (1): 93-99.
46. 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.
47. Martel-Pelletier J (1999): Proinflammatory mediators and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 7 (3): 315-316.
48. McKee CM, Penno MB, Cowman M, Burdick MD, Strieter RM, Bao C, Noble PW (1996): Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *J Clin Invest* 98 (10): 2403-2413.
49. Messner K, Fahlgren A, Ross I, Andersson B (2000): Simultaneous changes in bone mineral density and articular cartilage in a rabbit meniscectomy model of knee osteoarthrosis. *Osteoarthritis Cartilage* 8 (3): 197-206.
50. Miyake K, Medina KL, Hayashi S, Ono S, Hamaoka T, Kincade PW (1990): Monoclonal antibodies to Pgp-1/CD44 block lympho-hemopoiesis in long-term bone marrow cultures. *J Exp Med* 171 (2): 477-488.

51. Murray D (1964): Experimentally induced arthritis using intra-articular Papain. *Arthritis Rheum* 7: 211-219
52. Nishida Y, D'Souza AL, Thonar EJ, Knudson W (2000): Stimulation of hyaluronan metabolism by interleukin-1alpha in human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 43 (6): 1315-1326.
53. O'Connor, Visco D, Brandt K (1989): The development of experimental osteoarthritis in dogs with extensively deafferented knee joints. *Arthritis Rheum* 32: 106
54. Ostergaard K, Salter DM, Andersen CB, Petersen J, Bendtzen K (1997): CD44 expression is up-regulated in the deep zone of osteoarthritic cartilage from human femoral heads. *Histopathology* 31 (5): 451-459.
55. Palmoski M, Perricone E, Brandt KD (1979): Development and reversal of a proteoglycan aggregation defect in normal canine knee cartilage after immobilization. *Arthritis Rheum* 22 (5): 508-517.
56. Pond MJ, Nuki G (1973): Experimentally-induced osteoarthritis in the dog. *Ann Rheum Dis* 32 (4): 387-388.
57. 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.
58. Salter DM, Godolphin JL, Gourlay MS, Lawson MF, Hughes DE, Dunne E (1996): Analysis of human articular chondrocyte CD44 isoform expression and function in health and disease. *J Pathol* 179 (4): 396-402.
59. Sandell LJ, Aigner T (2001): Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res* 3 (2): 107-113
60. Sato MI, Koshino T, Takagi T (1999): CD44 expression on chondrocytes in knees of DBA/1 mice with type II collagen-induced arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 17 (2): 185-190.
61. Sreaton GR, Bell MV, Bell JI, Jackson DG (1993): The identification of a new alternative exon with highly restricted tissue expression in transcripts encoding the mouse Pgp-1 (CD44) homing receptor. Comparison of all 10 variable exons between mouse, human, and rat. *J Biol Chem* 268 (17): 12235-12238.
62. Sreaton GR, Bell MV, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JI (1992): Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (24): 12160-12164.
63. Shapiro F, Glimcher MJ (1980): Induction of osteoarthrosis in the rabbit knee joint. *Clin Orthop* (147): 287-295.

64. Shimizu Y, Van Seventer GA, Siraganian R, Wahl L, Shaw S (1989): Dual role of the CD44 molecule in T cell adhesion and activation. *J Immunol* 143 (8): 2457-2463.
65. Sleeman J, Rudy W, Hofmann M, Moll J, Herrlich P, Ponta H (1996): Regulated clustering of variant CD44 proteins increases their hyaluronate binding capacity. *J Cell Biol* 135 (4): 1139-1150.
66. Sneath RJ, Mangham DC (1998): The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. *Mol Pathol* 51 (4): 191-200.
67. Stamenkovic I, Amiot M, Pesando JM, Seed B (1989): A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. *Cell* 56 (6): 1057-1062.
68. Stamenkovic I, Aruffo A, Amiot M, Seed B (1991): The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate-bearing cells. *Embo J* 10 (2): 343-348.
69. Takahashi K, Goomer RS, Harwood F, Kubo T, Hirasawa Y, Amiel D (1999): The effects of hyaluronan on matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), interleukin-1beta(IL-1beta), and tissue inhibitor of metalloproteinase- 1 (TIMP-1) gene expression during the development of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 7 (2): 182-190.
70. Trochon V, Mabilat C, Bertrand P, Legrand Y, Smadja-Joffe F, Soria C, Delpech B, Lu H (1996): Evidence of involvement of CD44 in endothelial cell proliferation, migration and angiogenesis in vitro. *Int J Cancer* 66 (5): 664-668.
71. Underhill C (1992): CD44: the hyaluronan receptor. *J Cell Sci* 103 (Pt 2): 293-298.
72. Underhill CB, Green SJ, Comoglio PM, Tarone G (1987): The hyaluronate receptor is identical to a glycoprotein of Mr 85,000 (gp85) as shown by a monoclonal antibody that interferes with binding activity. *J Biol Chem* 262 (27): 13142-13146.
73. 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 Spec No 104-106.
74. Wachtler F (2000) Histologie. Lehrbuch der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen. Fakultas Univ. Verl., S. 140-143.
75. Westacott CI, Sharif M (1996): Cytokines in osteoarthritis: mediators or markers of joint destruction? *Semin Arthritis Rheum* 25 (4): 254-272.
76. Wirth K, Arch R, Somasundaram C, Hofmann M, Weber B, Herrlich P, Matzku S, Zoller M (1993): Expression of CD44 isoforms carrying metastasis-associated sequences in newborn and adult rats. *Eur J Cancer* 8 (7): 1172-1177

77. 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.
78. Yu Q, Toole BP (1996): A new alternatively spliced exon between v9 and v10 provides a molecular basis for synthesis of soluble CD44. *J Biol Chem* 271 (34): 20603-20607.
79. Zhang L, Underhill CB, Chen L (1995): Hyaluronan on the surface of tumor cells is correlated with metastatic behavior. *Cancer Res* 55 (2): 428-433.

## 6 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b> schematische Darstellung des CD44-Rezeptors (Abbildung nach J.Bajorath, Proteins: Structure, Function and Genetics (2000)).....	16
<b>Abbildung 2:</b> intraoperativer Lachmann-Test: Knie in Normalstellung.....	24
<b>Abbildung 3:</b> intraoperativer Lachmantest: deutlich nachweisbare vordere Schublade .....	24
<b>Abbildung 4:</b> Postoperative Wundverhältnisse beider Kniegelenke .....	25
<b>Abbildung 5:</b> Ausschnitt der Wundversorgung des rechten Knies.....	25
<b>Abbildung 6:</b> Anzahl der Gelenke mit Ulzerationen des Knorpels in Abhängigkeit der Wochen nach Operation.....	32
<b>Abbildung 7:</b> Anzahl der Gelenke mit osteophytären Anbauten in Abhängigkeit der Wochen nach Operation.....	33
<b>Abbildung 8:</b> Anzahl der Gelenke mit Erguss in Abhängigkeit der Wochen nach Operation.....	34
<b>Abbildung 9:</b> Vergleich des makroskopischen Arthrosegrades bei Scheinoperation bzw Kreuzbanddurchtrennung.....	35
<b>Abbildung 10:</b> intakter Knorpel beider Femurkondylen eines nicht operierten Tieres	35
<b>Abbildung 11:</b> deutliche Fibrillationen und Osteophytenbildung beider Femurkondylen 3 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung .....	36
<b>Abbildung 12:</b> beginnende Knorpeldefekte bis auf den Knochen (weiße Pfeile) und ausgeprägte Osteophytenbildung (schwarze Pfeile) 6 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung .....	36
<b>Abbildung 13:</b> Freilegung des subchondralen Knochens (schwarze Pfeile) und ausgeprägte Osteophytenbildung (weiße Pfeile) 12 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung .....	37
<b>Abbildung 14:</b> kräftige Anfärbung der Proteoglykane im Knorpel eines Tieres aus der Kontrollgruppe .....	38
<b>Abbildung 15:</b> beginnender Proteoglykanverlust im Knorpel 3 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung .....	38
<b>Abbildung 16:</b> fortgeschrittener Proteoglykanverlust 6 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung .....	39
<b>Abbildung 17:</b> fast vollständiger Verlust der Proteoglykane 12 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung .....	39

<b>Abbildung 18:</b> Vergleich histologischer Arthrosegrade bei Scheinoperation bzw. Kreuzbanddurchtrennung .....	40
<b>Abbildung 19:</b> Korrelation mikroskopischer und makroskopischer Arthrosegrad .....	41
<b>Abbildung 20:</b> intakter Knorpel eines nicht operierten Kaninchens .....	41
<b>Abbildung 21:</b> beginnende Störung der Knorpelarchitektur 3 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung .....	42
<b>Abbildung 22:</b> völlige Aufhebung der Knorpelarchitektur, Rissbildung und Bildung von Knorpelzell-Clustern 6 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung.....	42
<b>Abbildung 23:</b> tiefe Rissbildung und Zerstörung der Knorpeloberfläche 12 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung .....	43
<b>Abbildung 24:</b> bis auf einen schmalen Knorpelmatrixsaum vollständiger Verlust des Knorpels .....	43
<b>Abbildung 25:</b> Kontrolle der immunhistochemischen Färbung von CD44v5.....	44
<b>Abbildung 26:</b> Immunhistochemische Anfärbung von CD44v5.....	44
<b>Abbildung 27:</b> Kontrolle der immunhistochemischen Anfärbung von CD44v6 .....	44
<b>Abbildung 28:</b> Immunhistochemische Anfärbung von CD44v6.....	44
<b>Abbildung 29:</b> Entwicklung der CD44v5-Rezeptorexpression nach Kreuzbanddurchtrennung bzw. Scheinoperation.....	46
<b>Abbildung 30:</b> Korrelation von makroskopischen Arthrosegrad und CD44v5-Expression.....	46
<b>Abbildung 31:</b> Korrelation von mikroskopischem Arthrosegrad und CD44v5-Expression.....	47
<b>Abbildung 32:</b> CD44v5 Expression 3 Wochen nach Scheinoperation .....	48
<b>Abbildung 33:</b> 3 Wochen nach Kreuzband-durchtrennung .....	48
<b>Abbildung 34:</b> CD44v5 Expression 6 Wochen nach Scheinoperation .....	48
<b>Abbildung 35:</b> 6 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung .....	48
<b>Abbildung 36:</b> CD44v5 Expression 12 Wochen nach Scheinoperation .....	48
<b>Abbildung 37:</b> 12 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung .....	48
<b>Abbildung 38:</b> Entwicklung der CD44v6-Expression nach Kreuzbanddurchtrennung bzw Scheinoperation .....	49
<b>Abbildung 39:</b> Korrelation von mikroskopischem Arthrosegrad und CD44v6-Expression.....	50
<b>Abbildung 40:</b> Korrelation von makroskopischen Arthrosegrad und CD44v6-Expression.....	51
<b>Abbildung 41:</b> CD44v6 Expression 3 Wochen nach Scheinoperation .....	52

<b>Abbildung 42:</b> 3 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung .....	52
<b>Abbildung 43:</b> CD44v6 Expression 6 Wochen nach Scheinoperation .....	52
<b>Abbildung 44:</b> 6 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung .....	52
<b>Abbildung 45:</b> CD44v6 Expression 12 Wochen nach Scheinoperation .....	52
<b>Abbildung 46:</b> 12 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung .....	52

## 7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

**Priv.-Doz. Dr. med. Susanne Fuchs** für die Überlassung dieses Themas.

**Dr. med. Carsten Tibesku** für die freundschaftliche Zusammenarbeit und gute Betreuung.

**Dr. Thomas Szuwart** für die Unterstützung und fachliche Hilfestellung bezüglich verschiedener Färbeverfahren und der Begutachtung histologischer Bilder.

Der **MTA Sabine Kupich** für ihre Freundschaft, für ihre große Hilfsbereitschaft und für ihre unendliche Zähigkeit angesichts einer Vielzahl von Widrigkeiten.

**Uli Graefe** für seine Liebe und Geduld und für seine helfende Hand in Sachen EDV



## 8 Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name: Stephanie Anne-Marie Ilse Ocken

Vater: Rolf Ocken

Mutter: Brigitte Ocken

Familienstand: ledig

Geboren am 23.10.1976

Geburtsort: Koblenz

### Schulbildung

8/1983 Einschulung Deutsche Schule Belgrad

10/1984 – 7/1987 Grundschule „Schule am Pleiser Wald“ in Sankt Augustin

9/1987-7/1988 Albert-Einstein-Gymnasium in Sankt Augustin

9/1988-7/1991 Gymnasium Wentorf in Wentorf/ Hamburg

9/1991 -6/1996 Albert-Einstein-Gymnasium in Sankt Augustin

6/1996 Abitur

### Ausbildung

7/1996 Einstellung als Sanitätsoffiziersanwärter der Bundeswehr

4/1997 Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Universität Köln

4/1999 Physikum an der Universität Köln

4/1999 Fortsetzung des Medizinstudiums an der Westfälischen Wilhelms-Universität  
in Münster

4/2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

4/2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

6/2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

## Berufstätigkeit

Seit 6/2003 Tätigkeit als AiP in der HNO-Abteilung im Bundeswehrkrankenhaus Berlin

## 9 Anhang

### 9.1 Makroskopische Befunde

Gelenk	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	groß	durchtrennt
7 li	12	mittelgradig	kleinflächig	ausgeprägt	groß	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	groß	durchtrennt
11 li	12	ausgeprägt	kleinflächig	mittelgradig	groß	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	groß,Zysten	durchtrennt
16 li	3	mittelgradig	keine	mittelgradig	groß	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	groß,Zysten	durchtrennt
20 li	3	mittelgradig	großflächig	mittelgradig	groß	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

## 9.2 Histologische Befunde

Tier	Struktur	Zellen	Färbungsintensität Safranin-O	Integrität Übergangszone	Punktzahl Score
1re	1	0	2	1	4
1li	0	1	1	0	2
2re	1	0	2	1	4
2li	0	0	1	0	1
3re	0	0	1	0	1
3li	0	0	1	1	2
4re	4	2	3	1	10
4li	4	3	3	0	10
5re	1	0	1	1	3
5li	1	0	2	1	4
6re	1	0	1	1	3
6li	0	0	1	1	2
7re	3	3	3	1	10
7li	1	0	3	1	5
9re	1	0	1	1	3
9li	5	1	3	1	10
10re	0	0	1	1	2
10li	0	0	1	1	2
11re	5	2	3	1	11
11li	4	3	3	1	11
12re	2	2	3	1	8
12li	6	3	4	1	14
13re	0	0	1	0	1
13li	1	0	0	1	2
14re	0	0	3	0	3
14li	1	0	1	1	3
15re	0	0	0	0	0
15li	0	0	0	0	0
16re	3	3	3	1	10
16li	4	2	2	1	9
17re	1	1	1	1	4
17li	3	2	2	1	8
18re	4	2	3	1	10
18li	3	1	4	1	9
19re	1	3	3	0	7
19li	3	0	3	1	7
20re	1	3	4	1	9
20li	3	4	4	1	12
21re	0	1	1	1	3
21li	1	1	1	1	4
22re	0	0	2	0	2
22li	1	0	1	0	2
23re	1	1	1	1	4

<b>Tier</b>	<b>Struktur</b>	<b>Zellen</b>	<b>Färbungsintensität Safranin-O</b>	<b>Integrität Übergangszone</b>	<b>Punktzahl Score</b>
24li	1	1	1	1	4
25re	0	0	0	0	0
25li	0	0	0	0	0
N1re	0	0	0	1	1
N1li	0	0	1	0	1
N2re	0	0	0	0	0
N2li	0	0	0	0	0
N3re	0	0	2	0	2
N3li	0	0	2	0	2
N4re	0	0	3	1	4
N4li	0	1	3	0	4

Interpretation dieser Ergebnisse ist mittels Tabelle 2 möglich.

## 9.3 CD44v5-Expression

Gelenk	v5-positiv	Zellen gesamt	v5 in %	v5 / Gelenk
Gruppe: 3 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung				
16li1	132	218	60,55	56,04
16li2	17	33	51,52	
16re1	79	190	41,58	37,46
16re2	65	195	33,33	
19li1	128	157	81,53	58,08
19li2	18	52	34,62	
19re1	53	148	35,81	43,29
19re2	67	132	50,76	
20li1	51	183	27,87	29,73
20li2	12	38	31,58	
20re1	97	127	76,38	73,92
20re2	98	138	71,01	
22li1	78	200	39,00	37,64
22li2	103	284	36,27	
22re1	102	205	49,76	52,06
22re2	81	149	54,36	
Gruppe: 3 Wochen nach Scheinoperation				
21li1	97	163	59,51	57,38
21li2	79	143	55,24	
21re1	114	122	93,44	70,87
21re2	156	323	48,30	
14li1	119	121	98,35	98,71
14li2	106	107	99,07	
14re1	89	356	25,00	37,59
14re2	146	291	50,17	
23li1	132	265	49,81	49,42
23li2	126	257	49,03	
23re1	0	181	0,00	4,04
23re2	13	161	8,07	
24li1	138	287	48,08	43,99
24li2	150	376	39,89	
24re1	75	178	42,13	31,07
24re2	30	150	20,00	
Gruppe: 6 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung				
17li1	96	107	89,72	77,48
17li2	152	233	65,24	
17re1	84	197	42,64	45,7
17re2	117	240	48,75	
18li1	32	132	24,24	32,62
18li2	91	222	40,99	
18re1	93	116	80,17	67,09
18re2	108	200	54,00	

<b>Gelenk</b>	<b>v5-positiv</b>	<b>Zellen gesamt</b>	<b>v5 in %</b>	<b>v5/Gelenk</b>
9li1	98	280	35,00	40,08
9li2	112	248	45,16	
9re1	168	246	68,29	67,24
9re2	229	346	66,18	
4li1	60	60	100,00	99,26
4li2	133	135	98,52	
4re1	209	270	77,41	87,19
4re2	128	132	96,97	
Gruppe: 6 Wochen nach Scheinoperation				
13li	130	269	48,33	73,79
13li2	208	209	99,52	
13re1	193	334	57,78	58,3
13re2	150	255	58,82	
15li1	105	127	82,68	72,22
15li2	105	170	61,76	
15re1	130	289	44,98	62,22
15re2	178	224	79,46	
25li1	81	254	31,89	41,06
25li2	112	223	50,22	
25re1	46	338	13,61	14,91
25re2	58	358	16,20	
6li1	45	76	59,21	69,23
6li2	84	106	79,25	
6re1	89	241	36,93	40,64
6re2	110	248	44,35	
Gruppe: 12 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung				
11li1	175	180	97,22	98,36
11li2	201	202	99,50	
11re1	103	145	71,03	55,66
11re2	87	216	40,28	
12li1	110	143	76,92	49,53
12li2	60	271	22,14	
12re1	153	240	63,75	72,42
12re2	193	238	81,09	
7li1	82	125	65,60	68,59
7li2	68	95	71,58	
7re1	50	97	51,55	56,93
7re2	81	130	62,31	
Gruppe: 12 Wochen nach Scheinoperation				
1li1	157	329	47,72	52,05
1li2	137	243	56,38	
1re1	80	224	35,71	31,68
1re2	60	217	27,65	
2li1	108	280	38,57	45,55
2li2	73	139	52,52	
2re1	60	141	42,55	34,84
2re2	32	118	27,12	

<b>Gelenk</b>	<b>v5-positiv</b>	<b>Zellen gesamt</b>	<b>v5 in %</b>	<b>v5/Gelenk</b>
3li1	75	156	48,08	57,91
3li2	84	124	67,74	
3re1	48	420	11,43	12,12
3re2	53	414	12,80	
10li1	41	174	23,56	49,37
10li2	109	145	75,17	
10re1	80	193	41,45	32,59
10re2	51	215	23,72	
Gruppe: nicht operierte Tiere				
N1li1	57	247	23,08	30,87
N1li2	75	194	38,66	
N1re1	101	275	36,73	34,64
N1re2	109	335	32,54	
N2li1	112	357	31,37	32,69
N2li2	101	297	34,01	
N2re1	50	312	16,03	26,79
N2re2	110	293	37,54	
N3li1	0	234	0,00	0
N3li2	0	160	0,00	
N3re1	76	110	69,09	65,38
N3re2	74	120	61,67	
N4li1	35	187	18,72	20,2
N4li2	49	226	21,68	
N4re1	58	143	40,56	47,01
N4re2	62	116	53,45	



## 9.4 CD44v6-Expression

Gelenk	v6-positiv	Zellen gesamt	v6 in %	%v6/Gelenk
Gruppe: 3 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung				
16li1	30	218	13,76	11,42
16li2	3	33	9,09	
16re1	4	190	2,11	3,62
16re2	10	195	5,13	
19li1	19	157	12,10	34,89
19li2	30	52	57,69	
19re1	65	148	43,92	22,78
19re2	3	132	2,27	
20li1	15	183	8,20	33,04
20li2	22	38	57,89	
20re1	15	127	11,81	6,99
20re2	3	138	2,17	
22li1	15	200	7,50	3,75
22li2	0	284	0,00	
22re1	0	205	0,00	0,00
22re2	0	149	0,00	
Gruppe: 3 Wochen nach Scheinoperation				
21li1	8	163	4,91	3,15
21li2	2	143	1,40	
21re1	2	122	1,64	2,68
21re2	12	323	3,72	
14li1	2	121	1,65	6,90
14li2	13	107	12,15	
14re1	0	356	0,00	0,35
14re2	2	291	0,69	
23li1	6	265	2,26	1,33
23li2	1	257	0,39	
23re1	0	181	0,00	0,00
23re2	0	161	0,00	
24li1	0	287	0,00	0,00
24li2	0	376	0,00	
24re1	0	178	0,00	0,00
24re2	0	150	0,00	
Gruppe: 6 Wochen nach Kreuzbanddurchtrennung				
17li1	82	107	76,64	54,42
17li2	75	233	32,19	
17re1	3	197	1,52	0,76
17re2	0	240	0,00	
18li1	48	132	36,36	44,31
18li2	116	222	52,25	
18re1	11	116	9,48	6,49
18re2	7	200	3,50	

Gelenk	v6-positiv	Zellen gesamt	v6 in %	%v6/Gelenk
9li1	15	280	5,36	7,12
9li2	22	248	8,87	
9re1	15	246	6,10	3,49
9re2	3	346	0,87	
4li1	12	60	20,00	14,08
4li2	11	135	8,15	
4re1	37	270	13,70	6,85
4re2	0	132	0,00	
Gruppe: 6 Wochen nach Scheinoperation				
13li	1	269	0,37	2,82
13li2	11	209	5,26	
13re1	18	334	5,39	16,42
13re2	70	255	27,45	
15li1	0	127	0,00	0,00
15li2	0	170	0,00	
15re1	2	289	0,69	1,46
15re2	5	224	2,23	
25li1	8	254	3,15	2,25
25li2	3	223	1,35	
25re1	4	338	1,18	0,73
25re2	1	358	0,28	
6li1	19	76	25,00	18,63
6li2	13	106	12,26	
6re1	25	241	10,37	13,66
6re2	42	248	16,94	
Gruppe: 12 Wochen nach Kreuzbanddortrennung				
11li1	20	180	11,11	11,75
11li2	25	202	12,38	
11re1	88	145	60,69	45,63
11re2	66	216	30,56	
12li1	50	143	34,97	21,73
12li2	23	271	8,49	
12re1	38	240	15,83	15,06
12re2	34	238	14,29	
7li1	45	125	36,00	61,69
7li2	83	95	87,37	
7re1	90	97	92,78	53,70
7re2	19	130	14,62	
Gruppe: 12 Wochen nach Scheinoperation				
1li1	1	329	0,30	0,77
1li2	3	243	1,23	
1re1	5	224	2,23	6,42
1re2	23	217	10,60	
2li1	0	280	0,00	0,00
2li2	0	139	0,00	
2re1	0	141	0,00	0,00
2re2	0	118	0,00	

<b>Gelenk</b>	<b>v6-positiv</b>	<b>Zellen gesamt</b>	<b>v6 in %</b>	<b>%v6/Gelenk</b>
3li1	1	156	0,64	0,32
3li2	0	124	0,00	
3re1	2	420	0,48	0,97
3re2	6	414	1,45	
10li1	36	174	20,69	12,07
10li2	5	145	3,45	
10re1	0	193	0,00	0,70
10re2	3	215	1,40	
Gruppe: nicht operierte Tiere				
N1li1	0	247	0,00	0,26
N1li2	1	194	0,52	
N1re1	1	279	0,36	0,78
N1re2	4	335	1,19	
N2li1	1	357	0,28	0,14
N2li2	0	297	0,00	
N2re1	15	312	4,81	2,41
N2re2	0	293	0,00	
N3li1	0	234	0,00	2,50
N3li2	8	160	5,00	
N3re1	0	110	0,00	1,25
N3re2	3	120	2,50	
N4li1	12	187	6,42	4,32
N4li2	5	226	2,21	
N4re1	2	143	1,40	7,17
N4re2	15	116	12,93	

\*ENTWURF\*

Dateiname: N:\T\_VERS\GENNEU.wbz  
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 (BGBI. 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.

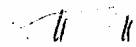
**Rechtsbehelfsbelehrung:**

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 Empfangsbe-  
kenntnisses.**

Mit freundlichen Grüßen  
I. A.

  
Dr. Wissing

**Eingegangen**  
 17. JULI 2000  
 Weitergeleitet an *[Handwritten Signature]*  
 Sekr. Prof. Winkelmann

DER  
OBERBÜRGERMEISTER

STADT  MÜNSTER

Postanschrift: Stadt Münster • 48127 Münster

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

**48149 Münster**

VETERINÄR- UND  
LEBENSMITTEL-  
ÜBERWACHUNGSAMT

Schelmenstiege 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.  
*[Handwritten Signature]*

Dr. Bolle  
Städt. Oberveterinärarzt

**Konten der Stadtkasse**

Sparkasse 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 48) Dresdner Bank Münster  
(BLZ 400 101 11) Volksbank Münster eG  
(BLZ 480 201 51) Westdeutsche Landesbank Münster

Kto.-Nr. 399 210 0/00 (BLZ 400 400 28)  
Kto.-Nr. 0470 005 (BLZ 400 700 80)  
Kto.-Nr. 606 465 600 (BLZ 400 900 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

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;**

<b>Tierversuch: A 58/2001</b>	
<b>Versuchsleiterin:</b> Frau Dr. Susanne Fuchs	<b>Stellvertreter und Antragsteller:</b> 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**

Stadtparkasse 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 49) Dresdner Bank Münster  
(BLZ 400 101 11) Volksbank Münster eG  
(BLZ 480 201 51) Westdeutsche Landesbank Münster

Kto.-Nr. 393 210 0/00 (BLZ 400 400 28)  
Kto.-Nr. 0470 005 (BLZ 400 700 80)  
Kto.-Nr. 006 485 600 (BLZ 400 800 40)  
Kto.-Nr. 4 200 800 (BLZ 401 600 50)  
Kto.-Nr. 61 228 (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

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

48149 Münster

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



