

Aus dem Institut für Versuchstierkunde sowie Zentrallaboratorium für Versuchstiere  
(Univ.-Prof. Dr. R. Tolba)  
der Medizinischen Fakultät der RWTH Aachen

Angefertigt unter der Leitung von  
PD Dr. S. Andereya

Vorgelegt über  
Prof. Dr. B. Aigner  
Veterinärwissenschaftliches Department der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Etablierung eines Arthrosemodells am Göttinger Minipig und  
Test eines neuartigen Kollagen-Knorpelzellträgers zur biologischen Rekon-  
struktion großflächiger Knorpeldefekte**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
**Nina Maria Gronloh**  
aus  
Würzburg

München 2009

Gedruckt mit Genehmigung  
der  
Tierärztlichen Fakultät  
der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Aigner

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Matis

Tag der Promotion: 06. Februar 2009

Meinen Eltern



---

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b><i>Einleitung</i></b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b><i>Literaturübersicht</i></b> .....	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Das Göttinger Minipig</b> .....	<b>2</b>
2.1.1	Entwicklung und Zucht .....	2
2.1.2	Haltung und Ernährung .....	3
2.1.3	Das Minipig als Versuchstier.....	4
<b>2.2</b>	<b>Weitere Tiermodelle</b> .....	<b>5</b>
<b>2.3</b>	<b>Das Kniegelenk des Minipigs</b> .....	<b>6</b>
2.3.1	Anatomie des Kniegelenks.....	6
2.3.2	Dynamik und Biomechanik des porcinen Kniegelenks im Vergleich zum menschlichen Kniegelenk.....	8
<b>2.4</b>	<b>Arthrose des Kniegelenks</b> .....	<b>10</b>
2.4.1	Ätiologie.....	10
2.4.2	Bisherige Behandlungsmöglichkeiten und Stand der Forschung.....	10
<b>3</b>	<b><i>Eigene Untersuchungen</i></b> .....	<b>13</b>
<b>3.1</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>13</b>
3.1.1	Versuchstiere .....	13
3.1.2	Prämedikation, Operationsvorbereitung und Narkose .....	13
3.1.3	Vorversuch.....	14
3.1.4	Hauptversuch.....	17
3.1.5	Präparation und Kultivierung der Chondrozyten .....	22
3.1.6	Herstellung der komprimierten Zell-Matrix-Konstrukte.....	23
3.1.7	Postoperative Behandlung.....	23
3.1.8	Verlaufskontrolle .....	24
3.1.9	Versuchsende.....	27
3.1.10	Postmortale Untersuchungen.....	28
3.1.11	Statistik.....	30
<b>3.2</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>32</b>
3.2.1	Versuchstiere, Prämedikation und Narkose.....	32

## Inhaltsverzeichnis

---

3.2.2	Vorversuch.....	33
3.2.3	Hauptversuch.....	42
3.2.4	Postoperativer Verlauf.....	42
3.2.5	Versuchsdauer.....	63
3.2.6	Postmortale Untersuchungen.....	65
3.2.7	Statistik.....	73
3.2.8	Zusammenfassung der Versuchsergebnisse.....	76
<b>4</b>	<b><i>Diskussion</i></b> .....	<b>78</b>
<b>4.1</b>	<b>Konzept des Versuchs</b> .....	<b>78</b>
<b>4.2</b>	<b>Tiermodell</b> .....	<b>79</b>
<b>4.3</b>	<b>Durchführung des Versuchs</b> .....	<b>80</b>
4.3.1	Anästhesie .....	80
4.3.2	Vorversuch.....	80
4.3.3	Hauptversuch.....	81
4.3.4	Bewertungssystem zur Beurteilung des Allgemeinbefindens .....	83
4.3.5	Sektion, Makroskopie und Histologie.....	85
4.3.6	Fazit.....	86
<b>5</b>	<b><i>Zusammenfassung</i></b> .....	<b>87</b>
<b>6</b>	<b><i>Summary</i></b> .....	<b>89</b>
<b>7</b>	<b><i>Literaturverzeichnis</i></b> .....	<b>91</b>
<b>8</b>	<b><i>Verzeichnisse</i></b> .....	<b>109</b>
<b>8.1</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>109</b>
<b>8.2</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>112</b>
<b>9</b>	<b><i>Danksagung</i></b> .....	<b>115</b>

## 1 Einleitung

Die gelenkerhaltende Behandlung von ausgedehnten Knorpelschäden und der Gonarthrose stellt bis heute ein ungelöstes Problem dar. In den meisten Fällen kommt es aufgrund der mangelnden Selbstheilungsfähigkeit des Knorpels nach einem Trauma oder durch Degeneration desselben zu einem fortschreitenden Gelenkverschleiß, der langfristig den künstlichen Gelenkersatz nach sich zieht. Um diese Entwicklung hinauszuzögern oder sogar zu verhindern, soll ein neues Verfahren und somit ein innovatives Behandlungskonzept entwickelt werden, das den Gelenkknorpel großflächig wiederherstellt.

Die Verwendung des Göttinger Minipig als Großtiermodell zur Überprüfung verschiedener Behandlungstechniken von Gelenkknorpelschäden wie zum Beispiel der Mosaikplastik, der autologen Knorpelzelltransplantation und der Kollagen-Zell-Matrixtransplantation ist international anerkannt. Bisherige Studien wurden jedoch nur an Defektmodellen durchgeführt, die keine arthrotisch veränderten Gelenke und nur fokal begrenzte, standardisierte chondrale Defekte aufwiesen.

Aus diesem Grund dient der erste Teil der vorliegenden Studie der Entwicklung eines Arthrosemodells am Minipig in vivo, das einen ausgedehnten und flächenhaften Knorpelschaden ähnlich dem Erscheinungsbild der Arthrose im Kniegelenk zeigt. Ziel ist die standardisierte und reproduzierbare Entfernung des Knorpels im Bereich der gesamten Trochlea.

Im zweiten Schritt erfolgt die Behandlung der induzierten Läsion durch Transplantation einer neuartigen verdichteten Kollagen-Zell-Matrix mit hoher Festigkeit und Primärstabilität. Ziel dieses Studienteils ist die biologische Rekonstruktion des gesamten Defektes. Die Durchführung und Auswertung der Studie erfolgt intraindividuell, wobei die Matrixkonstrukte gegen einen identisch großen Leerdefekt verglichen werden.

Ein besonderes Augenmerk liegt während der gesamten Studie auf dem Allgemeinbefinden der Minipigs und der durch die Operationen auftretenden Schmerzen für die Tiere. Ziel ist es, eine Aussage darüber zu treffen, ob Läsionen dieser Größe im Sinne des Tierschutzes ethisch vertretbar sind, und das Verfahren somit aus versuchstierkundlicher Sicht als großflächiges Arthrosemodell etabliert werden kann.

## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Das Göttinger Minipig**

#### 2.1.1 Entwicklung und Zucht

Grund für die Entwicklung des Göttinger Miniaturschweins war der steigende Bedarf an einem Modelltier für die biologische Forschung, das die anatomischen und physiologischen Verhältnisse des Hausschweins besitzt, aber kleiner und einfacher zu handhaben ist (Leucht et al. 1982).

Prof. Fritz Haring aus Göttingen begann 1960 mit der Zucht von Miniaturschweinen. Diese fand auf dem Versuchsgut Friedland der Universität Göttingen statt (Glodek und Oldigs 1981). Grundlage für die Zucht in Göttingen waren zunächst das Minnesota Miniaturschwein und das Vietnamesische Hängebauchschwein mit dem Zuchtziel, den Typ und das Temperament des „Minnesota Miniature Pig“ mit der Kleinwüchsigkeit und Fruchtbarkeit des Vietnamesischen Hängebauchschweins zu kombinieren. Da für die radiologische und dermatologische Forschung zunehmend unpigmentierte Tiere gefordert wurden und in der Ausgangspopulation keine rein weißen Tiere vorkamen, wurden dominant weiße Hausschweine der Deutschen Landrasse eingekreuzt. Somit konnte eine Ausgangspopulation für die „Weiße Linie“ des Göttinger Minipigs geschaffen werden (Glodek und Oldigs 1981, Haring et al. 1967). Im Jahr 1969 wurde auf dem Versuchsgut Relliehausen der Universität Göttingen eine spezifiziert-pathogenfreie (SPF)-Basiszuchtanlage gebaut, die Raum für 100 Sauen samt Nachkommen bot. Eingestellt wurden in dieser SPF-Anlage nur Tiere, die mittels Hysterektomie entbunden und ohne Kontakt zu den adulten Tieren künstlich aufgezogen worden waren (Glodek et al. 1977). Da es aufgrund der starken Gewichtsverminderung zu einer Reduzierung des Gesundheitszustandes und infolge dessen zu einer Reduzierung der Fruchtbarkeit und Aufzuchtleistung der Sauen kam, wurden Anfang der 80er Jahre die Ziele der Selektion erweitert. Neben dem Körpergewicht der Tiere spielten auch die Anzahl der Zitzen, die Wurfleistung der Sauen, die Anzahl und Qualität der Ohrvenen, sichtbare Defekte und das Temperament eine bedeutende Rolle (Ellegaard: [www.minipigs.dk](http://www.minipigs.dk)). 1992 wurden 38 trächtige Sauen zur Rederivation mittels Kaiserschnitt nach Dalmose, Dänemark gebracht. Mittlerweile existiert dort eine Zucht, die mit durchschnittlich 2,1 Würfen pro Sau pro Jahr und 6,6 Ferkel pro Wurf eine ausreichende Zahl an Minipigs für den Europäischen Markt liefern kann. Die Population besteht zurzeit aus neun Zuchtlinien, die Inzuchtrate beträgt dabei unter 10 % (El-

legaard: [www.minipigs.dk](http://www.minipigs.dk)). Die Minipigs der Firma Ellegaard sind Auszuchttiere und besitzen ein Zertifikat, das Geburtsdatum, individuelle Gewichtsentwicklung und die Ergebnisse der Gesundheitsuntersuchungen nach den Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) - Richtlinien enthält ([www.felasa.eu](http://www.felasa.eu)).

### 2.1.2 Haltung und Ernährung

Die Haltung der Minipigs ist abhängig vom Einsatz der Tiere. Grundsätzlich gelten in Deutschland Mindestanforderungen für die Haltung durch die Verordnung zum Schutz von Schweinen bei Stallhaltung (Schweinehaltungsverordnung 2006).

Die Firma Ellegaard stellt für die Haltung ihrer Minipigs in Laufställen oder Käfigen Richtwerte bereit (Tabelle 1 und 2).

Tabelle 1: Angaben der Firma Ellegaard für die Haltung von Minipigs in Laufställen

<b>Gewicht des Tieres (kg)</b>	<b>Minimale Bodenfläche (m<sup>2</sup>)</b>	<b>Minimale Stalllänge (m)</b>	<b>Minimale Stallbreite (m)</b>	<b>Mindestfläche bei Gruppenhaltung (m<sup>2</sup>/Tier)</b>	<b>Mindestlänge des Troges (m)</b>
10-30	2	1,6	0,8	0,2	0,2
30-50	2	1,8	1,0	0,3	0,25

Tabelle 2: Angaben der Firma Ellegaard für die Haltung von Minipigs in Käfigen

<b>Gewicht des Tiere (kg)</b>	<b>Mindestfläche/ Tier (m<sup>2</sup>)</b>	<b>Mindesthöhe (cm)</b>
5-15	0,35	50
15-25	0,55	60
25-40	0,80	89

Das Stallklima wird dem Alter und somit dem Bedarf der Tiere angepaßt. In der Zuchtanlage der Universität Göttingen liegen die relative Luftfeuchtigkeit bei 60-70 % und die Temperatur bei 18 °C. Im Abferkelstall herrschen in der ersten Lebenswoche der Ferkel 30 °C, in der zweiten bis vierten Woche 26 °C. Der Tag-/Nacht-Rhythmus beträgt 12 Stunden (h) /12 h

(Glodek und Oldigs 1981). In den Ställen der Firma Ellegaard herrschen je nach Alter der Tiere zwischen 18 °C und 28 °C und eine relative Luftfeuchte von 50-70 %. Neugeborenen Ferkeln werden beheizte Böden angeboten. Der Tag-Nacht-Rhythmus beträgt ebenfalls 12h/12h.

Wie Minipigs im Rahmen von Versuchen gehalten werden, hängt vom Versuch selbst, aber auch von den räumlichen Begebenheiten ab. Da Minipigs gesellige Tiere sind, sollte ihnen - unabhängig davon, ob sie sich im Versuch befinden oder nicht - der regelmäßige Kontakt zu den Artgenossen gewährt werden. Generell können Minipigs analog zu Läufern oder Sauen in Gruppen gehalten werden. Im Tierversuch wird bei entsprechender Indikation auch die Einzelhaltung der Tiere, wenn möglich unter Sicht-, Laut- und Geruchskontakt zu den Artgenossen, durchgeführt. Hierbei ist auf die gesetzlichen Vorgaben zu achten (Schweinehaltungsverordnung 2006; Europäischen Übereinkommen zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere 2006).

Das Minipig nimmt - wie für Hausschweine üblich - wesentlich mehr Futter auf als es für seine Erhaltung braucht (Fortmeyer und Wirth 1984). Dies führt dazu, dass die Tiere schon sehr früh zu Adipositas per magna neigen. Um dies zu verhindern, empfiehlt es sich, alle Altersgruppen mit Ausnahme der Saugferkel nicht ad libitum, sondern rationiert zu füttern. Der Zugang zu Wasser steht allen Tieren ad libitum zu Verfügung. Im Zuchtbetrieb der Firma Ellegaard bekommen die Minipigs eine kalorienarme Diät. Ein Kilogramm Futter entspricht hierbei 10 Megajoule (MJ). Die Alteber, die im Institut für Versuchstierkunde des Universitätsklinikums Aachen gehalten wurden, bekamen eine 1:1 Mischung aus rohfaserreichen und rohfasearmen Minipigfutter der Firma Altromin, Lage, Deutschland gefüttert (Tagesration von 800g).

### 2.1.3 Das Minipig als Versuchstier

Die Organsysteme des Schweins, wie das Skelett-, das Herz-Kreislaufsystem, die Haut, der Magen-Darmtrakt, die Nieren sowie das Pankreas weisen eine große Ähnlichkeit zu denen des Menschen auf (Koolhaas et al. 1995). Zudem ist das Schwein für eine Anzahl von Krankheitserregern des Menschen anfällig und die pharmakologische Ansprechbarkeit ähnlich zu der des Menschen (Haring et al. 1963). Im Gegensatz zu Studien mit Schweinen sind Ergebnisse aus Studien mit Nagetieren, Hasenartigen, Hunden und Katzen aufgrund der

nisse aus Studien mit Nagetieren, Hasenartigen, Hunden und Katzen aufgrund der geringeren Ähnlichkeit zum Menschen oft weniger gut auf den Menschen übertragbar. Zu berücksichtigen ist auch eine geringe gesellschaftliche Akzeptanz, die durch die Beziehung des Menschen zu Hunden und Katzen als Haustieren oder im Rahmen von Versuchen mit Affen vorherrscht.

Deshalb wird das Schwein am häufigsten als Großtiermodell in der biomedizinischen Forschung verwendet (Swindle 2007). Häufige Einsatzgebiete sind Transplantationsversuche wie Herz-, Pankreas-, Nieren-, Leber- oder Darmtransplantation, plastische und Verbrennungschirurgie, kardiovaskuläre und gastrointestinale Forschung, Pädiatrie, Radiologie, experimentelle Chirurgie sowie Urologie.

Mit der Züchtung von Miniaturschweinerassen wurden die Einsatzmöglichkeiten für die Forschung signifikant verbessert. In folgenden Bereichen werden zunehmend Untersuchungen an Miniaturschweinen durchgeführt: Herz-Kreislauf-Forschung, Ernährungsphysiologie, Pharmakologie und Toxikologie, Dermatologie und plastische Chirurgie, Onkologie und Strahlenbiologie, Orthopädie und zahnmedizinische Forschung (Fortmeyer und Wirth 1984). In der orthopädischen Forschung wurde das Göttinger Miniaturschwein mittlerweile vielfach eingesetzt, wie z. B. für Studien des Knochenstoffwechsels (Borah et al. 2002, Tsutsumi et al. 2004), in der Erforschung der Reparatur von Knochenbrüchen (Raschke et al. 1999, Schnettler et al. 2003) oder fokalen Knorpeldefekten (Bail et al. 2003, Chang et al. 2006, Gotterbarm et al. 2003, Hembry et al. 2001, Hunziker 1999, Hunziker 2001, Hunziker und Rosenberg 1996, Mainil-Varlet et al. 2001) und im Rahmen von Studien zur Implantatfixierung (Buser et al. 1991).

## **2.2 Weitere Tiermodelle**

Der orthopädischen Forschung stehen neben dem Minipig noch weitere Tiermodelle zu Verfügung. Das Kaninchen ist das für Studien zur Knorpelreparation (Amiel et al. 1985, Amiel et al. 1988, Brittberg et al. 1996, Furukawa et al. 1980, Grande et al. 1989, Hogervorst et al. 1992, Hunziker 1999, O`Driscoll et al. 1986, Wakitani et al. 1989) am häufigsten verwendete Tiermodell, da es aufgrund seiner Körpergröße für operative Eingriffe gut zu handhaben, gut verfügbar und ökonomisch erschwinglich ist (An und Friedmann 1999). Das Kaninchen weist an der Trochlea eine Knorpeldicke von circa 0,4 mm auf (Chang et al. 2006, Hunziker 1999, Räsänen und Messner 1996, Shortkoff et al. 1996). Dies entspricht 1/7 bis 1/5 der menschl-

chen Knorpeldicke in diesem Bereich, somit ist ein „partial-thickness“ Defekt beim Menschen in etwa einem „full-thickness“ Defekt beim Kaninchen (Hunziker 1999) gleichzusetzen. Im Gegensatz zu Schweinen zeigt das Kaninchen durch seine hohe Stoffwechselrate eine große Fähigkeit zur Selbstheilung von Knorpelschäden (Gotterbarm et al. 2003).

Der Hund wird neben dem Minipig ebenfalls als Großtiermodell in der orthopädischen Forschung eingesetzt (Breinan et al. 1997, Klompaker et al. 1992, Lee et al. 2000, Nehrer et al. 1998). Die Trochlea des Hundes weist eine Knorpeldicke von 0,6-1,3 mm auf. Shortkroff et al. (1996) beschreiben eine Knorpeldicke von 0,5-0,8 mm. Bei einem Einsatz des Hundes als Versuchstier ist neben den aufwendigen Haltungsanforderungen und den Kosten (Borrie und Mitchell 1960) der Status des Hundes als Haustier zu berücksichtigen. Durch die emotionale Bindung des Menschen an den Hund ist die gesellschaftliche Akzeptanz für Studien mit Hunden gering (An und Friedmann 1999).

Schaf und Ziege, die ein durchschnittliches Gewicht von 70-80 kg haben und somit gute anatomische Vergleiche zum Menschen zulassen, wurden in verschiedenen Studien zur Reparatur von Knorpelläsionen eingesetzt (Homminga et al. 1991, Jackson et al. 1996, Jackson et al. 2001, Lane et al. 2004, Shahgaldi et al. 1991). Im Kniegelenk von Schaf und Ziege existiert eine Knorpeldicke von 0,6-0,8 mm (Hunziker 1999).

Das Pferd kommt mit einer Knorpeldicke von 1,5-2 mm für diesen Parameter den anatomischen Begebenheiten im menschlichen Kniegelenk sehr nahe und wurde aus diesem Grund in der Forschung zur Knorpelreparatur eingesetzt (Convery et al. 1972, Litzke et al. 2004, Vachon et al. 1986). Der Einsatz des Pferdes als Versuchstier birgt hohe Kosten durch die Anschaffung und die aufwendige Unterbringung und Versorgung der Tiere in sich. Hinzu kommt die schwierigere Handhabung des Tieres durch seine Größe.

### **2.3 Das Kniegelenk des Minipigs**

#### 2.3.1 Anatomie des Kniegelenks

Die Beschreibungen der anatomischen Verhältnisse sind den Publikationen von König und Liebich (2008) und Nickel et al. (2003) entnommen. Das Kniegelenk setzt sich aus dem Kniekehlgelenk (Articulatio femorotibialis) und dem Kniescheibengelenk (Articulatio femoropatellaris) zusammen.

---

Das Kniekehlgelenk wird von den Kondylen des Os femoris und der Gelenkfläche, Facies articularis der Tibia gebildet. Während die Femurkondylen stark gekrümmt sind, ist die Facies articularis des Schienbeins fast eben. Zum Ausgleich dieser Inkongruenz befinden sich zwei mandarinenförmige Menisken zwischen den Gelenkflächen. Eine weitere Aufgabe der Menisken ist die Pufferung und Druckübertragung im Gelenk. Befestigt sind die Menisken an der Tibia durch ein kraniales und kaudales Tibialband, wodurch sie sich beim Strecken und Beugen des Gelenks zusammen mit dem Schienbein über die Femurkondylen bewegen. Durch die Verschiebbarkeit der Menisken und die Form der Gelenkflächen sind neben Streck- und Beugbewegungen auch eingeschränkte Drehbewegungen des eigentlichen Wechselgelenks möglich. Die Verbindung des Femur mit der Tibia wird durch Seitenbänder, Ligamenta collateralia und gekreuzte Bänder, Ligamenta cruciata genus gewährleistet.

Das Kniescheibengelenk wird von der Trochlea des Femurs und der Patella gebildet. Die Patella ist als Sesambein in die Endsehne des Musculus quadriceps eingelagert. Die Trochlea des Femurs zeichnet sich durch eine konvexe, von zwei Rollkämmen umgebene Gleitfläche aus, auf welcher die Kniescheibe wie ein Schlitten gleitet. Beim Kniescheibengelenk handelt es sich somit um ein sogenanntes Schlittengelenk, *Articulatio delabens*, einer Variation des Walzengelenks. Der Musculus quadriceps, der an der Darmbeinsäule und am Os femoris entspringt und zur Tuberositas tibiae zieht, ist der stärkste Strecker des Kniegelenks. Er liegt an der Vorderseite des Oberschenkels und besteht aus vier Anteilen, die alle an der Tuberositas tibiae ansetzen. In seiner Funktion als Strecker des Kniegelenks ist er bedeutend am Vorwärtsbewegen des Körpers beteiligt und dient zudem der Fixierung des Kniegelenks und somit der gesamten Gliedmaße. Als so genannter Hilfsstrecker des Kniegelenks fungiert der Kniekehlmuskel, Musculus popliteus, der in der Kniekehle direkt auf der Gelenkkapsel aufliegt. Neben diesen beiden Kniegelenksmuskeln beteiligen sich noch verschiedene Hüftgelenksmuskeln, insbesondere die „Hinterbackenmuskulatur“ (Nickel et al. 2003) an der Bewegung des Kniegelenks. Der Musculus tensor fasciae latae bedeckt als großer fächerförmiger Muskel den Quadriceps und trägt zur Streckung des Kniegelenks bei. Der Musculus biceps femoris liegt direkt unter der Haut am Oberschenkel. Mit seiner kranialen Portion fungiert er als Strecker des Hüft- und Kniegelenks, mit der kaudalen Portion als Beuger des Kniegelenks. Als Gesamtmuskel ist der Bizeps ein Abduktor und Strecker der gesamten Gliedmaße. Der Musculus semitendinosus entspringt beim Schwein am Sitzbeinhöcker und an den Dorn- und Querfortsätzen der ersten Schwanzwirbel und endet medial an der Tibia. Zusätzlich entsendet er noch eine Fersenbeinsehne an den Calcaneus. In der Stützbeinphase streckt er Hüft-, Knie-

und Sprunggelenk und schiebt somit den Körper nach vorne. Im Hangbein beugt er das Kniegelenk und dient als Ein- und Rückführer der Gliedmaße. Der Musculus semimembranosus liegt an der medialen Fläche der Hinterbacke. Seine Wirkung in der Stützbeinphase ist die Streckung des Hüft- und Kniegelenks verbunden mit dem Vorwärtsschieben des Rumpfes. In der Hangbeinphase wird durch ihn die Gliedmaße nach innen oder hinten geführt. Der Musculus satorius und der Musculus gracilis sind durch das Einstrahlen in die Fascia genus und Fascia cruris an der Streckung des Kniegelenks beteiligt. Der Musculus gastrocnemius, der von den beiden Femurkondylen entspringt und als Achillessehne am Tuber calcanei ansetzt, dient als Strecker des Sprunggelenks und als Beuger des Kniegelenks.

### 2.3.2 Dynamik und Biomechanik des porcinen Kniegelenks im Vergleich zum menschlichen Kniegelenk

#### 1) Funktion der Hintergliedmaßen und Körperschwerpunkt:

Während die Vorderextremitäten des Minipigs eine Stützfunktion innehaben, besitzen die Hintergliedmaßen eine Schiebefunktion in Form eines antreibenden Hebels (Haxton 1947, Nickel et al. 2003). Bei zurückgestellter Hintergliedmaße ist auch die Funktion als antreibende Stütze möglich (Gray 1944). Für den Vierbeiner ist die antreibende Funktion der Hintergliedmaßen wichtiger als die stützende Funktion. Die unteren Gliedmaßen des Menschen haben als Tragsäule eine stützende Funktion, die für den Zweibeiner ebenso wichtig ist wie der antreibende Hebel (Haxton 1947).

Beim Minipig liegt der Schwerpunkt im Bereich des Thorax, dadurch liegen nur 1/3 des Körpergewichtes auf den Hintergliedmaßen, das bedeutet bei einem 30 kg schweren Tier eine Belastung von 7,5 kp auf den Hintergliedmaßen (Harms et al. 1978). Simon (1970) beziffert in einer Studie mit verschiedenen Quadrupeden (Maus, Ratte, Hund, Schaf, und Rind) die Gewichtsverteilung zwischen Vorder- und Hintergliedmaßen in einem Verhältnis von 60:40 bis 55:45. Beim Menschen liegt der Körperschwerpunkt im Unterbauch und somit in der Nähe der Längsachse der unteren Gliedmaßen (Haxton 1947). Dies führt dazu, dass das gesamte Körpergewicht von den unteren Gliedmaßen getragen wird.

## 2) Belastung der Hintergliedmaße in Bewegung:

Im Schritt und Trab wird eine Hintergliedmaße des Minipigs immer zusammen mit einer Vordergliedmaße belastet, entweder mit der gleichseitigen Vordergliedmaße oder der Vordergliedmaße der kontralateralen Seite. Dies führt dazu, dass das Körpergewicht in keiner Phase der Fortbewegung alleine auf einem Bein ruht. Lediglich im Galopp wird eine Hintergliedmaße kurzzeitig vor Aufsetzen der zweiten allein belastet (Harms et al. 1978). Der Schrittzklus des Menschen besteht aus einem Doppelschritt mit Schwung- und Standphase eines Beines (Harms et al. 1978). Beim Gehen und Laufen des Menschen muss das Körpergewicht während 2/3 der Standphase von einem Bein allein getragen werden (Harms et al. 1978).

## 3) Anatomische Voraussetzungen für die jeweilige Funktion:

Das Minipig benötigt starke Extensoren der Hüfte und starke Flexoren an Knie- und Fesselgelenk. Diese werden durch die hintere Oberschenkelmuskulatur, Anteile des Biceps femoris und den M. gastrocnemius verkörpert. Das Bein des Menschen ist ausgestattet mit starken Streckern der Hüfte und des Kniegelenks und starken Flexoren der Fessel: Musculus gluteus maximus, Musculus quadriceps und Musculus soleus.

## 4) Stellung des Kniegelenks:

Beim Minipig wird das Kniegelenk in allen Stellungen der Extremität in Form einer Beugung beansprucht. Untersuchungen an verschiedenen Quadrupeden ergeben einen Winkel des Kniegelenks zwischen 100° und 135°-140° (Reynolds 1987). Dies führt zu einem dauerhaften großflächigen Kontakt der Patellagelenkfläche mit dem Patellagleitlager. Das Kniegelenk des Menschen erfährt beim Gehen eine Beugung von 160°-170° (Eberhardt et al. 1954), wobei laut Waldeyer und Mayet (2003) eine aktive Beugung bis 130° möglich ist. Im Standbein spricht Kapandji (1985) von einer Neutralnullstellung. In dieser Streckstellung ruht die Patella mit ihrer distalen Gelenkfläche auf dem proximalen Teil der Facies patellaris femoris. Bei Beugung des Knies schiebt sich die Patella über das Patellargleitlager, und der proximale Teil der patellaren Gelenkfläche schert über den distalen Teil der Facies patellaris femoris.

## **2.4 Arthrose des Kniegelenks**

### 2.4.1 Ätiologie

Die Arthrose des Kniegelenks wird als Gonarthrose bezeichnet. Primäre Arthrosen entstehen ohne feststellbaren Grund. Sekundären Arthrosen dagegen liegen exogene oder endogene Faktoren zugrunde. Als endogene Ursachen sind Systemfaktoren wie Synovitiden und rheumatoide Arthritis anzusehen. Zu den exogenen Faktoren zählen biomechanische Über- oder Fehlbelastung des Gelenks oder Traumata (Behrens et al. 2004). Sowohl exogene als auch endogene Faktoren führen zu einer Veränderung der Knorpeloberfläche. Die extrazelluläre Matrix des Knorpels wird durch Chondrozyten gebildet. Da adulter Knorpel keine Blutversorgung und somit keinen Zugang zur regenerativen Zellpopulation besitzt, hat er eine sehr eingeschränkte Heilungskapazität (Reinholz et al. 2004). Dies führt bei Knorpeldefekten ohne Beteiligung des subchondralen Knochens dazu, dass eine Regeneration nur geringfügig von den Randgebieten des Defektes ausgehen kann. Bei Beteiligung des subchondralen Knochens, so genannten „full thickness“ Defekten, kann ein Ersatzfasergewebe gebildet werden (Behrens et al. 2004). Inwieweit das neugebildete Gewebe den alten Knorpelstrukturen gleicht, hängt von Alter des Patienten und der Größe und Lokalisation des Defektes ab (Reinholz et al. 2004).

### 2.4.2 Bisherige Behandlungsmöglichkeiten und Stand der Forschung

Für die Behandlung vollschichtiger Knorpeldefekte am Kniegelenk gibt es mittlerweile eine Reihe von Möglichkeiten. Eine rein symptomatische Behandlung erfährt das erkrankte Gelenk bei der so genannten Lavage oder dem Debridement. Bei der Lavage wird das erkrankte Gelenk endoskopisch gespült, um es von möglichen Fremdkörpern wie losen Knorpelstücken zu befreien. Das Debridement beinhaltet das Glätten von rauhen Knorpeloberflächen, Entfernen von losen Knorpelablagerungen und abgelösten oder degenerierten Meniskusfragmenten und das Angleichen des verbleibenden Meniskus zu einer einheitlichen Oberfläche. Ein weiterer positiver Effekt dieser Methoden auf den Heilungsprozess entsteht durch das Herausspülen von Entzündungsmediatoren aus dem Gelenk und der Entfernung von Proteoglykanen der Extrazellulärmatrix (Hunziker et al. 1998, Wei et al. 1997). Eine Kombination von Lavage und Debridement ist möglich (Moseley et al. 2002). Beide Verfahren sind nicht in der Lage, zerstörten Knorpel wieder aufzubauen (Gaissmaier et al. 2003, Marlovits et al. 2006). In einer randomisierten, placebo-kontrollierten Studie von Moseley et al. (2002) wurde gezeigt, dass

es keine befriedigende Verbesserung bezüglich der Schmerzen oder Funktionalität des Kniegelenks nach einer Lavage in Kombination mit oder ohne Debridement gibt. Ebenso zeigten Marlovits und Vécsei (2000), dass durch Debridement und Lavage keine langfristige Beschwerdefreiheit oder Rekonstruktion des Knorpels möglich war. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass der Erfolg dieser Therapie für jüngere Patienten größer war als für ältere (Bernard et al. 2004). Zusammenfassend läßt sich sagen, dass der therapeutische Wert dieser Behandlungsoption als eher gering einzustufen ist.

Neben diesen rein symptomatischen Behandlungen existieren Verfahren, bei denen es zum Ersatz beziehungsweise zur Rekonstruktion des Knorpels kommt. Die Periost- und Perichondriumtransplantation wird durchgeführt, weil Periost und Perichondrium pluripotente Stammzellen enthalten, die die Fähigkeit besitzen, zu Chondrozyten zu differenzieren (Brittberg 1996, Bulstra et al. 1990). Kurz nach der Operation zeigt sich eine gute Wiederherstellung des Knorpels. Im Verlauf können aber Ossifikationen im Transplantat oder Sklerosierung desselben auftreten. Nur bei einer geringen Anzahl von Patienten wird bei Nachuntersuchungen eine intakte Oberfläche im Gelenk vorgefunden. Zudem weisen diese Methoden hohe Komplikations- und Revisionsraten auf (Behrens et al. 2004).

Bei der Osteochondral autologous transplantation (OATS) oder Mosaikplastik werden Knochen-Knorpelzylinder von 4-12 mm Durchmesser und einer Länge von 15-25 mm aus weniger belasteten Bereichen der Femurkondylen entnommen und in den Defektbereich transplantiert (Gaissmaier et al. 2003). Nachteil dieses Verfahrens ist eine Beschädigung des subchondralen Knochens an der Explantationsstelle und eine daraus resultierende Einschränkung der Gelenkfunktion. Je mehr Zylinder transplantiert werden, desto größer wird die Auswirkung der Beschädigung an der Explantationsstelle. Kurz- bis mittelfristig sind die Ergebnisse bei kleinen Defekten überwiegend gut (Behrens et al. 2004). Die limitierende Größe eines Defektes für die Mosaikplastik oder OATS liegt bei 2 cm<sup>2</sup> (Jones and Peterson 2006). Hangody et al. berichten von einer maximal möglichen Defektdeckung von 4 cm<sup>2</sup> im Rahmen einer 10-Jahres-Studie (Behrens et al. 2004).

Das Prinzip der Mikrofrakturierung und der Anbohrung des Knochens besteht in der Eröffnung des subchondralen Knochens. Infolge der Eröffnung kommt es zunächst zu einer Einblutung, gefolgt vom Einwandern unspezifischer Zellen. Das im weiteren Verlauf gebildete fibröse Narbengewebe besitzt eine reduzierte Belastbarkeit, wodurch es im Laufe der Zeit erneut zu einem Knorpeldefekt kommt. Bei Untersuchungen, die im ersten Behandlungsjahr stattfin-

den, zeigt die Mikrofrakturierung gute Ergebnisse. Spätere Untersuchungen allerdings zeigen einen schlechteren Heilungsverlauf (Gaissmaier et al. 2003).

Bei der klassischen autologen Chondrozytentransplantation (ACT) mit Periostdeckung, die von Brittberg et al. 1994 eingeführt wurde, wird der Knorpeldefekt mit einer Suspension aus Chondrozyten aufgefüllt und mit einem Periostlappen bedeckt, der vom Tibiakopf entnommen wird (Andereya et al. 2004). Transplantiert werden circa  $1 \times 10^6$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  Defektfläche. Diese Methode eignet sich gut für Defekte, die größer als  $2 \text{ cm}^2$  und kleiner als  $12 \text{ cm}^2$  sind (Jones und Peterson 2006). In zahlreichen Studien werden der ACT auch im Langzeitverlauf sehr gute Ergebnisse bescheinigt (Brittberg et al. 1994, Andereya et al. 2004). Die häufigste Komplikation dieser Methode ist eine Transplantathypertrophie, die vom Periostlappen ausgeht (Behrens et al. 2004). Daneben kann es zu Delamination oder Kalzifikationen kommen, welche eine operative Revision notwendig machen (Andereya et al. 2004, Marlovits et al. 2006).

Um den genannten Nachteilen der ACT entgegenzuwirken, wurden Trägermaterialien für die ACT entwickelt. Die Kultivierung der Chondrozyten findet hierbei in einer Matrix statt, wodurch eine homogene Verteilung der Zellen stattfinden und die Dedifferenzierung der Chondrozyten verringert werden kann. Als Grundlage für die protein- und kohlenhydratbasierten Trägermaterialien dienen Kollagen, Fibrin, Gelatine, Hyaluron, Agarose, Alginat und Chitosan. Synthetische und artifizielle Träger enthalten Kohlefaser, Teflon und Dacron (Andereya et al. 2004). Schneider und Andereya zeigten 2003 in einer klinischen Vergleichsstudie mit einem neu entwickelten Kollagengel die Vorteile der trägergekoppelten ACT gegenüber der klassischen ACT. 2007 veröffentlichten Andereya et al. eine viel versprechende, zweijährige Verlaufstudie, in der femoropatellare Knorpelschäden mit einem 3-dimensionalen Kollagen-I-Gel gedeckt wurden. Der Einsatz der Trägermaterialien wurde bisher an fokalen Defekten getestet.

Auf dieser Grundlage soll eine neuartige Kollagen-Zell-Matrix mit hoher Festigkeit, die eine Weiterentwicklung des Kollagengels darstellt, zur biologischen Rekonstruktion großflächiger Knorpeldefekte eingesetzt werden. Im Rahmen des beschriebenen Projektes wird die neue Kollagen-Zell-Matrix auf ihre Effektivität hinsichtlich der Reparation großer Knorpeldefekte, ähnlich denen der Kniegelenksarthrose, untersucht. Erweist sich die neue Methode im Tierversuch als valide und reproduzierbar, ist eine klinische Phase-I-Studie beim Menschen geplant.

### **3 Eigene Untersuchungen**

#### **3.1 Material und Methoden**

##### 3.1.1 Versuchstiere

Für die Studie wurden männliche Göttinger Minipigs mit einem durchschnittlichen Gewicht von 59 kg verwendet. Es wurden Tiere im Alter von 3 bis 5 Jahren verwendet, da bei diesen Minipigs geschlossene Epiphysenfugen vorliegen.

Die Tiere wurden von der Georg-August-Universität Göttingen (Versuchsgut Relliehausen) bezogen. Bei Anlieferung der Tiere im Institut für Versuchstierkunde der RWTH Aachen wurden diese klinisch untersucht sowie eine Kotuntersuchung auf Parasiten eingeleitet.

Die Tiere wurden in Gruppen von zwei bis vier Tieren auf Stroh gehalten. Die Tierräume hatten eine nutzbare Bodenfläche von 13-14 m<sup>2</sup>. Die Raumtemperatur in den Tierräumen betrug 20 ± 2 °C bei einer 15-18fachen Luftwechselrate/h mit Hepa-gefilterter Luft (Hepa Stufe H13), einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 ± 20 % und einem Tag/Nachtrhythmus von 12 h/12 h. Die Minipigs wurden 2x täglich mit einer 1:1 Mischung aus einem rohfaserreichen und rohfasearmen Minipigfutter (Mini-Pig Haltung, 4mm, pelletiert) der Firma Altromin gefüttert (Tagesration von 800 g) und hatten ad libitum Zugang zu Wasser.

Nach einer Eingewöhnungszeit von mindestens einer Woche wurden die Tiere zur Vorbereitung auf die Narkose 24 h nüchtern gesetzt. Wasser stand ad libitum zur Verfügung.

Die Tierversuche wurden nach den Vorgaben des Deutschen Tierschutzgesetzes mit Genehmigung der Behörde für Tierversuche – ehemals Bezirksregierung Köln - des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW (LANUV, Recklinghausen) durchgeführt.

##### 3.1.2 Prämedikation, Operationsvorbereitung und Narkose

Die Prämedikation erfolgte mittels 4 mg/kg Körpergewicht (KG) Azaperon (Stresnil®, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) und 0,044 mg/kg KG Atropinsulfat (Atropinum sulfuricum solutum 1%, Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG, Garbsen, Deutschland) in einer Mischspritze intramuskulär in den Musculus brachiocephalicus. Nach weiteren 10 Minuten (min) erfolgte die Gabe von 15 mg/kg KG Ketamin (10 % ige Lösung, CEVA Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf, Deutschland) intramuskulär. Danach wurde ein 20 Gauge (G) Venenver-

## Eigene Untersuchungen

---

weilkatheter (Vygonüle V, Vygon GmbH und Co. KG, Aachen, Deutschland) in die Ohrvene gelegt. Die Narkose wurde mit 20-40 mg/kg KG Pentobarbital (Narcoren, Merial GmbH, Halbermoos, Deutschland) intravenös eingeleitet. Aufgrund der stark gewebereizenden Wirkung wurde das Barbiturat mit isotoner 0,9 % Natriumchloridlösung (NaCl) 1:1 verdünnt.

Die Tiere wurden mit einem Tubus von 8,0-8,5 mm Durchmesser (HiLo Lanz, Mallinckrodt Medical Inc., Athlone, Irland) intubiert und die Spontanatmung kontinuierlich kontrolliert. Nach Rasur und Waschen beider Hinterläufe wurden beide Kniegelenke der Tiere geröntgt (antero-posterior = a.p., rechts seitlich und links seitlich), um die Beschaffenheit der am Kniegelenk beteiligten Strukturen vor der Operation zu dokumentieren. Die Röntgenbilder wurden mit Datum und Tiernummer versehen archiviert. Danach wurden die Tiere in den Operationsaal gebracht, auf dem Rücken gelagert und an das Beatmungssystem angeschlossen (Fabius, Dräger Medizintechnik GmbH, Lübeck, Deutschland). Beatmet wurde mit 1,5 Vol % Isofluran (Forene, Abott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) in einem Sauerstoff-/Luftgemisch von 1:2 als kontrollierte Beatmung. Die präemptive Gabe von 4 mg/kg KG Carprofen (Rimadyl, Pfizer GmbH, Karlsruhe, Deutschland) erfolgte intramuskulär. 750 mg Cephalexin (Zinacef, GlaxoSmithKline GmbH und Co KG, München, Deutschland) wurden als Kurzinfusion in 20 ml 0,9 % NaCl und 0,05-0,1 mg Fentanyl (Fentanyl-Janssen, Janssen GmbH, Neuss, Deutschland) als Bolus intravenös verabreicht.

Die Überwachung der Tiere fand mittels EKG (Siemens) und Capnometrie über einen Atemgasmonitor PM8050 (Dräger Medizintechnik GmbH, Lübeck, Deutschland) statt. Über das Narkosegerät wurden folgende Parameter überwacht: Atemwegspartialdrücke, Beatmungsvolumina und Atemgaskonzentrationen (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, Isofluran).

### 3.1.3 Vorversuch

Im Rahmen des Vorversuchs wurde 6 Minipigs Chymopapain (C8526-1UK, Firma Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland) in die Kniegelenke injiziert, um zu überprüfen, ob eine Arthrose chemisch zu induzieren ist.

Die Narkose wurde dazu wie beschrieben eingeleitet, die Tiere wurden analgetisch und antibiotisch versorgt, zur Erfassung des Gelenkzustandes geröntgt (a.p., rechts seitlich und links seitlich) und für den Eingriff auf dem Rücken gelagert. Die Röntgenbilder wurden mit Tiernummer und Datum versehen und archiviert. Nach sterilem Abdecken und Desinfizieren des

Operationsfeldes wurde das Kniegelenk paramedian lateral circa 5 mm neben der Patellarsehne mittels einer Kanüle (20G) punktiert. Zur Lagekontrolle der Injektionsnadel wurde das Gelenk mit steriler 0,9 % NaCl-Lösung infiltriert, und nach Aspirieren der infiltrierten Lösung die Chymopapainlösung injiziert. Nach erfolgter Injektion wurde die Nadel wieder entfernt, die Narkose ausgeleitet, und die Tiere in Einzelboxen gebracht. Sobald die Minipigs wieder vollständig wach und reaktionsfähig waren, wurden sie zu den anderen Tieren in die Gruppe zurückgesetzt.

Postoperativ bekamen die Minipigs zur Minimierung der Schmerzen 5 Tage lang 4 mg/kg KG Carprofen per os. Eine Verlaufskontrolle der Veränderung der Kniegelenke fand mittels Röntgenuntersuchung einmal pro Woche statt.

Die Chymopapaingabe erfolgte bei 3 Gruppen zu je 2 Tieren wie folgt:

Gruppe 1: Gabe von 100 Internationalen Einheiten (U) Chymopapain in das Kniegelenk beidseits, zweite Gabe von 100 U Chymopapain in das Kniegelenk beidseits nach 8 Wochen, Euthanasie der Tiere 12 Wochen nach der ersten Gabe

Gruppe 2: Gabe von 500 U Chymopapain in das rechte Kniegelenk, Euthanasie der Tiere nach 8 Wochen

Gruppe 3: Gabe von 1000 U Chymopapain in das rechte Kniegelenk, Euthanasie der Tiere nach 8 Wochen

Die Tiere wurden nach 8 bzw. 12 Wochen euthanasiert, die Kniegelenke (a.p., rechts seitlich und links seitlich) geröntgt, eröffnet, die Gelenkstrukturen photodokumentiert und makroskopisch anhand eines modifizierten Bewertungsschemas nach O'Driscoll beurteilt (Tabelle 3). Sowohl die Trochlea als auch beide Femurkondylen wurden zur Aufarbeitung entnommen. Die durch Chymopapain veränderten Chondrozyten wurden auf die klassischen Charakterisierungseigenschaften von Knorpelzellen untersucht. Die zu untersuchenden Faktoren waren Kollagen Typ I und Typ II. Es fanden immunhistologische und histologische Färbemethoden Anwendung. Die Klassifizierung erfolgte ebenfalls anhand des modifizierten Bewertungssystems nach O'Driscoll (Tabelle 3). Eine gute Beurteilung entspricht hierbei einer hohen Punktzahl, ein schlechtes Ergebnis wird mit einer niedrigen Punktzahl bewertet.

Tabelle 3: Bewertungssystem zur Beurteilung der Makroskopie und Histologie des Gelenkknorpels an der Trochlea (modifiziert nach O`Driscoll et al. 1986).

## Makroskopie

Adhäsionen	(1) ja (2) nein
Randleiste	(1) kein Bonding (2) partielles Bonding (3) vollständiges Bonding
Oberfläche	(1) zerfurcht (2) rau (3) glatt
Kontur	(1) vertieft (2) erhöht (3) auf gleicher Höhe
Regenerat (im Vergleich zum umliegenden Knorpel)	(1) weich (2) härter (3) gleich
<b>Gesamtpunktzahl</b>	

## Histologie

Gewebebeschaffenheit	(1) fibrös (2) wenig differenzierter Knorpel (3) hyalinartig
Oberflächenregularität	(1) schwere Fibrillationen/Fissuren (2) geringe Fibrillationen/Fissuren (3) intakte Oberfläche
Strukturelle Integrität (unterhalb der Oberfläche)	(1) schwere durchgehende Fissuren/Spalten (2) geringe Fissuren (3) intakt
Verbindung zur Knorpelschulter	(1) kein Bonding (2) partielles Bonding (3) vollständiges Bonding
Höhe des Regenerats (im Vergleich zum umliegenden Knorpel)	(1) vertieft (2) erhöht (3) auf gleicher Höhe
Kollagen II	(1) wenig (2) mittel (3) hoch
<b>Gesamtpunktzahl</b>	

### 3.1.4 Hauptversuch

Nach Auswertung des Vorversuchs zeigte sich, dass eine Arthrose in dem gewünschten Ausmaß mittels Chymopapain beim Minipig nicht zu erreichen war. Deshalb wurde die Arthrose im Hauptversuch mechanisch induziert. Der Hauptversuch wurde mit 18 Tieren geplant. Im Versuchsverlauf mussten in der Gruppe der 6-Wochen-Tiere zusätzlich 4 Ersatztiere eingesetzt werden, woraus eine Tierzahl von 22 Minipigs resultierte.

Bei den 22 eingesetzten Göttinger Minipigs wurde die Wirksamkeit eines neuartigen Kollagen-Netz-Konstruktes bei großflächigen Knorpelschäden im direkten Vergleich des behandelten Kniegelenks (rechts) zum unbehandelten, arthrotisch veränderten Kniegelenk der kontralateralen Seite (links) erprobt.

18 Tiere wurden in drei Versuchsgruppen zu je 6 Tiere eingeteilt:

- a) Tiere mit einer Beobachtungszeit von 6 Wochen (+ 4 Ersatztiere)
- b) Tiere mit einer Beobachtungszeit von 3 Monaten
- c) Tiere mit einer Beobachtungszeit von 12 Monaten

Alle Eingriffe erfolgten unter Intubationsnarkose der Tiere in Rückenlage, nach Rasieren des Operationsgebietes, Desinfektion und sterilem Abdecken der Kniegelenke. Zur Kontrolle des C-reaktiven Proteins (CRP) als Entzündungsparameter im Serum wurde den Tieren Blut über die Ohrvene abgenommen. Das Blut wurde zentrifugiert, das Serum abpipettiert und zur Untersuchung zu einem späteren Zeitpunkt mit Tiernummer und Datum archiviert. Die Serumproben wurden jeweils vor der ersten Operation (Tag 1), vor der zweiten Operation (Tag 14) und am Tag des Versuchsendes entnommen. Analog zu dem Vorversuch wurden die Tiere analgetisch und antibiotisch versorgt. Ebenso wurden beide Kniegelenke der Minipigs zu Dokumentation der Ausgangslage geröntgt.

Der Hauptversuch bestand aus zwei Teilprojekten.

- 1) Mechanische Induktion des Knorpeldefektes (Abrasion):

Der Hautschnitt erfolgte circa 2 cm medial der Medianebene des Kniegelenks in Form eines etwa 8 cm langen Längsschnittes. Die anliegende Haut wurde mit einer Schere stumpf gelöst. Danach wurde die Haut nach lateral verlagert und von lateral das Kniegelenk eröffnet. Damit

## Eigene Untersuchungen

---

wurden der Hautschnitt und der Schnitt in die Gelenkkapsel als potentielle Eintrittspforte für Erreger versetzt durchgeführt. Nach dem Hautschnitt wurde - unter Schonung der Muskulatur - bis auf die Kapselbandstrukturen präpariert. Das Kniegelenk wurde paramedian mittels einer Kanüle (20 G) punktiert und zur Lagekontrolle der Injektionsnadel mit 2-6 ml steriler 0,9 % NaCl-Lösung infiltriert. Durch Aspirieren wurde steril Synovialflüssigkeit gewonnen. Danach wurde das Kniegelenk lateral eröffnet und die Kniescheibe nach medial disloziert. Dies erfolgte unter Streckung des Kniegelenks. Nach Dislokation der Kniescheibe wurde das Kniegelenk stark gebeugt, um die Gelenkfläche der Trochlea gut zugänglich zu machen (Abbildung 1).



Abbildung 1: Darstellung der Trochlea nach medialem Zugang durch die Gelenkkapsel

Mittels Kürette wurde der Knorpel der gesamten Trochlea auf einer Fläche von 1,5 cm x 2,5 cm abradert (Abbildung 2), so dass der Knorpel vollständig entfernt war (Abbildung 3).

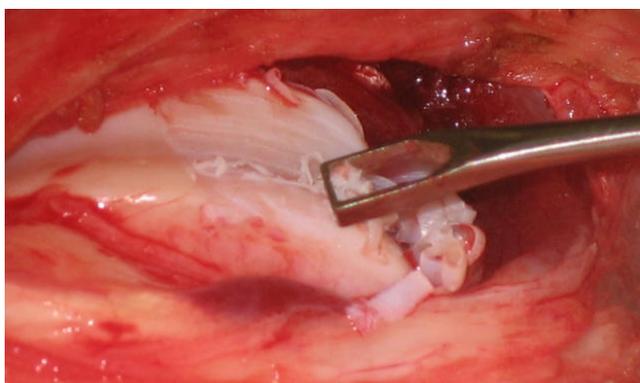


Abbildung 2: Abrasion des Knorpels an der Trochlea mittels Kürette



Abbildung 3: Subchondraler Knochen der Trochlea nach vollständiger Abrasion des Knorpels

Nach Relokation der Kniescheibe erfolgte der Gelenkkapselverschluss mittels fortlaufender Kapselbandnaht (Vicryl 4-0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland), die Subkutannaht mit Einzelheften (Vicryl 2-0 und Vicryl 3-0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) und der Hautverschluss mittels Klammern (Einmal-Hautklammergerät APPOSE ULC 15W, BRAUN-DEXON GmbH, Spangenberg, Deutschland). Danach wurde die Operationsstelle mit Aluminiumspray (Albrecht GmbH und Co. KG, Aulendorf, Deutschland) abgedeckt. Nach dem Narkoseende und Wiederauftreten der Spontanatmung wurden die Tiere zunächst in die Einzelboxen gebracht. Waren die Tiere wieder vollständig wach und reaktionsfähig, kamen sie in ihre Gruppe zurück. Die postoperative Schmerzbehandlung erfolgte wie unter 3.1.7 beschrieben.

Die Knorpelentfernung wurde in identischer Weise in beiden Kniegelenken durchgeführt.

Das abgetragene Knorpelgewebe wurde steril asserviert und zur Anfertigung von Kollagengelen mit autologen Chondrozyten verwendet. Dies erfolgte im Orthopädischen Forschungslabor (Frau S. Steinebach, Herr Dr. K. Gavenis) des Universitätsklinikums Aachen (siehe 3.1.5. und 3.1.6).

## 2) Deckung der Läsion:

Zwei Wochen nach der mechanischen Induktion der großflächigen Knorpelläsion standen die Kollagengelen mit autologen Chondrozyten (Kollagen-Zell-Matrix) zur Verfügung. Die Matrices wurden in Petrischalen mit sterilem Kulturmedium geliefert.

## Eigene Untersuchungen

---

Die Gelenkeröffnung und Matrixtransplantation wurde nur am rechten Kniegelenk durchgeführt. Der operative Zugang erfolgte in identischer Weise zur Defektinduktion. Nach Eröffnung des Kniegelenks wurde das Gelenk mit 0,9 % NaCl gespült. Um einen festen Halt der Matrix durch transossär geführte Einzelknopfnähte zu gewährleisten, wurde an allen vier Ecken des Defektes ein Loch gebohrt (Druckluftbetriebene Bohrmaschine, Synthes GmbH, Freiburg, Deutschland) und je ein Faden (Vicryl 6-0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) vorgelegt (Abbildung 4).



Abbildung 4: Transossäre Bohrungen mit vorgelegten Vicryl 6-0 Fäden für die Fixation der Matrix durch Einzelhefte

Um das Transplantat auf die entsprechende Defektgröße anzupassen, wurde zunächst eine sterile Folie auf den Defekt gelegt und entsprechend zugeschnitten. Das Transplantat wurde nach dieser Vorlage zugeschnitten und die Passgenauigkeit überprüft. Nach Spülung des Gelenks mit NaCl und Trocknen der Defektfläche wurde auf die präparierte Trochlea ganzflächig Fibrinkleber (Tissucol Duo S, Baxter GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) aufgetragen und das Transplantat vorsichtig mit einer Pinzette angedrückt (Abbildung 5).

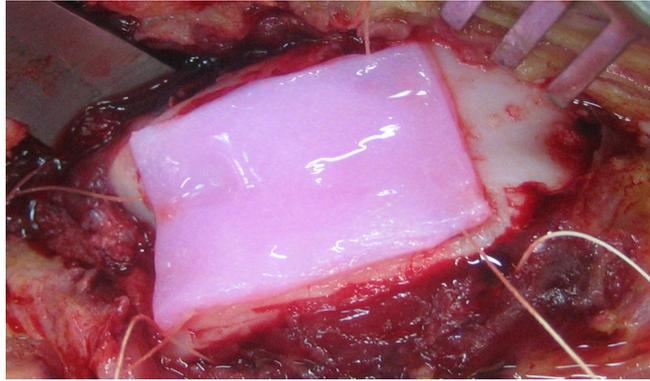


Abbildung 5: Aufgebrachte autologe Kollagen-Zell-Matrix auf die Trochlea

Überschüssiger Fibrinkleber wurde sorgfältig entfernt. Zum Schutz der Matrix gegenüber den einwirkenden Scherkräften wurde diese mit einer Membran (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Schweiz) bedeckt, die so zugeschnitten wurde, dass sie an allen Seiten die Matrix um circa 2 mm überlappte. Mit den bereits vorgelegten Fäden wurde die schützende Membran im Randbereich an allen vier Ecken durchstoßen und in die transosseär geführten Einzelknopfnähte mit einbezogen (Abbildung 6). Somit wurde eine ausreichende Primärstabilität des Transplantats erreicht.

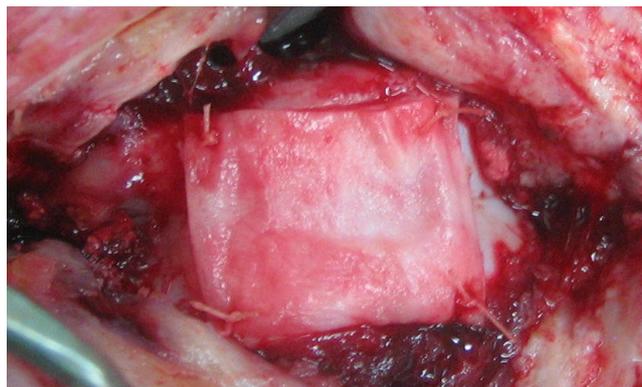


Abbildung 6: Fixation der Matrix und der Schutzmembran mittels Einzelknopfnähten

Nach erneutem Spülen des Gelenks erfolgte der Wundverschluss analog zur mechanischen Induktion des Knorpeldefektes. Nach der Operation wurden die Tiere in die Gruppe zurückgebracht. Die postoperative Schmerzbehandlung erfolgte wie unter 3.1.7 beschrieben.

### 3.1.5 Präparation und Kultivierung der Chondrozyten

Die Präparation und Kultivierung der Chondrozyten wurde vom Labor der Orthopädischen Klinik (Frau S. Steinebach, Herr Dr. K. Gavenis) des Universitätsklinikums Aachen durchgeführt.

Das bei der mechanischen Induktion der Knorpelläsion entnommene Knorpelgewebe wurde in sterilen Gefäßen mit 10 ml Kulturmedium (DMEM, 10 % Humanserum, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 5 µg/ml Chloramphenicol) (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) 10 bzw. 11 Tage (d.h. bis 3 Tage vor der geplanten Implantation) im Brutschrank (Forma Scientific Modell 3110, Fa. Biotron, Hilden, Deutschland) unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % relative Luftfeuchtigkeit) kultiviert.

Die Knorpelstücke wurden mit Hilfe eines Skalpells in etwa 1-2 mm<sup>3</sup> große Stücke zerkleinert und in ein 50 ml Zellkultur Röhrchen (Greiner, Solingen, Deutschland) gegeben. Zur enzymatischen Freisetzung der Chondrozyten wurde das Kulturmedium (10 ml DMEM-Medium, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) mit 1 mg/ml Liberase Blendzym 3 (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) versetzt und für 15 h im Brutschrank rotierend inkubiert. Danach wurden die Zellen zur Abtrennung nicht verdauter Knorpelstücke durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 100 µm gegeben und für 10 min bei 1400 Umdrehungen/min (rpm) (Eppendorf Zentrifuge 5804R, Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment aus Chondrozyten wurde dreimal nacheinander in 10 ml DMEM-Medium resuspendiert und wie oben beschrieben erneut pelletiert. Zum Abschluss wurden die Zellen in 10 ml DMEM-Medium resuspendiert und die Zellzahl im Zellzählautomaten CASY1 (Schärfe System, Reutlingen, Deutschland) bestimmt. Die gereinigten Zellen wurden im Anschluss unmittelbar zur Herstellung der komprimierten Zell-Matrix-Konstrukte verwendet.

### 3.1.6 Herstellung der komprimierten Zell-Matrix-Konstrukte

Die Herstellung der komprimierten Kollagengele wurde im Orthopädischen Forschungslabor (Frau S. Steinebach, Herr Dr. K. Gavenis) des Universitätsklinikums Aachen durchgeführt.

Zur Herstellung der zellbesiedelten Matrix-Konstrukte wurden zunächst  $4 \times 10^5$  Chondrozyten pelletiert und in einem Kollagen Typ-I Gel (Arthro Kinetics, Esslingen, Deutschland) aufgenommen, das 1:1 mit einer Mischung aus 2x DMEM-Medium und 1M HEPES-Puffer (0,93,0,07) versetzt worden war. Zur Kompression dieses zellbesiedelten Kollagen Typ-I Gels wurden 38,5 ml desselben in eine Plexiglas-Kompressionseinheit überführt und bei 37 °C im Brutschrank zum Gelieren gebracht. Die verwendete Plexiglas-Kompressionseinheit hatte eine runde Grundfläche mit einem Durchmesser von 6 cm und eine Höhe von 20 cm. Nach 1 h wurde unter sterilen Bedingungen ein passgenauer Stempel in die Kompressionseinheit auf das gelierte Kollagengel aufgesetzt und mit Gewichten beschwert, um das zellbesiedelte Kollagengel auf eine Höhe von 1 mm zu komprimieren. Das nach der Kompression vorliegende verdichtete, zellbesiedelte Kollagengel hatte einen Durchmesser von 6 cm und eine Dicke von 1 mm. Die Transplantatdicke von 1 mm wurde durch die Dicke des nativen Minipigknorpels vorgegeben. Die Gesamtzellzahl im komprimierten Gel betrug  $2 \times 10^5$  Zellen /ml. Nach Abschluss der Kompression wurde das Konstrukt unter sterilen Bedingungen entnommen und stand zur Implantation bereit.

### 3.1.7 Postoperative Behandlung

Die akute Schmerzbehandlung erfolgte postoperativ nach der mechanischen Induktion des Knorpelschadens drei Tage lang und nach der Defektdeckung fünf Tage lang. Die Tiere wurden sowohl nach der Defektinduktion als auch nach der Defektdeckung mit oralen und intramuskulären Analgetika behandelt. In den ersten beiden Tagen nach der Operation wurden die Tiere mit 0,005-0,01 mg/kg KG Buprenorphin (Temgesic, Essex Pharma GmbH, München, Deutschland) intramuskulär und 4 mg/kg KG Carprofen (Rimadyl-Tabletten 100mg, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) per os 1x täglich behandelt. Ab Tag 3 erfolgte die analgetische Versorgung allein mit Rimadyl. Ab dem 4. bzw. 6. Tag wurde die Schmerzbehandlung dem klinischen Erscheinungsbild der Tiere angepasst. Bei auftretenden Lahmheiten oder Nichtbelasten der operierten Gliedmaßen wurde die Rimadylgabe verlängert. Falls ein Tier die Tabletten nicht mit dem Futter aufnahm, wurde Rimadyl intramuskulär verabreicht.

## Eigene Untersuchungen

---

Parallel zu der analgetischen Behandlung wurden die Tiere nach der Deckung des Defektes mit Antibiotika behandelt. Ab dem 1. postoperativen Tag bis zum 3. Tag nach der Defektdeckung wurde den Tieren 1x täglich 2,5 mg/kg KG Enrofloxacin (Baytril 10 %, BayerVital GmbH & Co. KG, Leverkusen, Deutschland) intramuskulär verabreicht. Zusätzlich zu Baytril wurden die Tiere nach der Defektdeckung mit 15 mg/kg KG Amoxicillin (Duphamox LA, Fort Dodge Veterinär GmbH, Würselen, Deutschland) intramuskulär die ersten 4 postoperativen Tage behandelt.

Das Befinden der Tiere wurde täglich kontrolliert und schriftlich dokumentiert. Zwei Wochen nach der Deckung des Knorpeldefektes wurde bei den Tieren eine Kurznarkose eingeleitet (4 mg/kg KG Azaperon und 0,044 mg/kg KG Atropinsulfat in einer Mischspritze intramuskulär, nach zehn Minuten 15 mg/kg KG Ketamin intramuskulär). Die Hautklammern wurden entfernt und zur Kontrolle der Gelenkflächen Röntgenbilder beider Hinterläufe angefertigt (a.p., rechts seitlich, links seitlich).

### 3.1.8 Verlaufskontrolle

#### 3.1.8.1 Beurteilung des Allgemeinbefindens und der Schmerzintensität

Die Verlaufskontrolle startete präoperativ. Das Augenmerk lag dabei auf dem Normalverhalten, dem individuellen Charakter und der Stellung in der Gruppe. Das Befinden wurde bei den Tieren der 6-Wochen- und 3-Monats-Versuche über den gesamten Zeitraum täglich kontrolliert und dokumentiert. Bei den 12-Monats-Tieren, die aufgrund von Umbaumaßnahmen in Aachen nach Gut Frankenforst der Universität Bonn ausgelagert wurden, fand eine engmaschige Kontrolle in den ersten vier Wochen nach der Defektdeckung statt. 7 Monate nach Deckung der Läsion und am Versuchsende erfolgte eine tägliche Kontrolle für jeweils zwei Wochen.

Für die Bewertung des Allgemeinbefindens und der Schmerzintensität der Eingriffe wurde eine vor Versuchsbeginn entworfene numerische Verhaltens- und Schmerzbewertungstabelle (Tabelle 4) verwendet, bei der es sich um ein modifiziertes Bewertungssystem nach Otto (2001) handelte. Die numerischen Schmerztabelle, die von Otto für Hund und Schaf beschrieben werden, wurden unter Berücksichtigung von Verhaltensweisen, die für Schweine typisch sind, modifiziert. Schmerzbedingte Verhaltensweisen wie das „Toben“ und „Hin- und Herrollen“ (Otto, 2001) oder Wimmern und Winseln als Form der Vokalisation, die typisch für Hunde sind, wurden in der Tabelle für Minipigs durch Absonderung von der Gruppe, fehlende Kontaktaufnahme, Fluchtverhalten und Zähneknirschen ersetzt. Des Weiteren wurde auf die mögliche

Beruhigung der Hunde durch Streicheln verzichtet, da für Schweine Berührungen Stress bedeuten. Die Bestimmung der Herzfrequenz wurde aus demselben Grund nicht in die Schmerztabelle für Minipigs übernommen. Die Bewertungstabelle für Schafe nach orthopädischen Eingriffen berücksichtigt die Beurteilung des Gesichtsausdruckes des Tieres, da Schafe bei Schmerzen flehmen oder einen stoischen Ausdruck bekommen. Diese Kriterien sind ebenso wie das Wiederkauen der Schafe nicht auf das Minipig anzuwenden und wurden somit ausgeschlossen. Ergänzt wurde die Tabelle für die Miniaturschweine um das Komfortverhalten wie Nestbau, Liegen in Gruppen und das Scheuern an Gegenständen. Ebenso erfolgte die Untersuchung des Lahmheitsgrades.

Die Beurteilung des Schmerzes und des Allgemeinzustandes der Tiere basierte im Wesentlichen auf Beobachtungen des Einzeltieres. Zunächst wurden das Spontanverhalten, das Sozialverhalten und die Atemfrequenz des Tieres aus der Distanz beurteilt. Im zweiten Schritt wurde das provozierte Verhalten beurteilt. Dieses wurde durch Zugehen auf das Tier, Kontaktaufnahme und Palpation der Wunde ausgelöst. Das verwendete Belastungs-Bewertungssystem ist zum modifizierten O'Driscoll-System umgekehrt proportional, d.h. eine gute Beurteilung des Allgemeinbefindens ergibt eine niedrige Punktzahl (sehr gut = 0), eine schlechte Beurteilung eine hohe Punktzahl (sehr schlecht = 15).

Tabelle 4: Numerische Verhaltens- und Schmerzbewertungstabelle (Modifiziert nach Otto 2001)

<b>Bewertungskriterien</b>	<b>Erscheinungsformen</b>	<b>Punktwert</b>
<b>Futter/ Tränkeaufnahme</b>	Normale Futteraufnahme	0
	Verhaltene Futteraufnahme bei Zusprache	1
	Verweigert Futteraufnahme vollständig	2
<b>Aktivität</b>	Schläft oder döst ruhig in Gruppen	0
	Reagiert neugierig und nimmt Kontakt auf	0
	Komfortverhalten (Spielen, Scheuern, Nestbau)	0
	Reduzierte Aktivität	1
	Bewegungsunlust und geringe Neugierde	2
	Keinerlei Kontaktaufnahme/liegt gesondert	3
	Apathisch	4
<b>Lahmheitsgrad</b>	Steht und geht normal	0
	Geringgradige Lahmheit	1
	Deutliche Lahmheit	2
	Zeitweise Entlastung der betroffenen Gliedmaße	3
	Keine Belastung der betroffenen Gliedmaße, liegt überwiegend	4
<b>Lautäußerungen</b>	Keine	0
	Gelegentliches Zähneknirschen	1
<b>Atemfrequenz</b>	Normal: 10-20 Atemzüge/Minute	0
	> 20 Atemzüge/Minute	1
	> 30 Atemzüge/Minute	2
<b>Provoziertes Verhalten</b>	Normal, kontaktfreudig	0
	Dem Untersucher ausweichend	1
	Ausgeprägtes Fluchtverhalten	2
	Aggression, verstärkte Vokalisation	3

#### *3.1.8.2 Wundheilung*

Neben der Beurteilung von Verhalten und Allgemeinzustand der Tiere wurde der Wundbereich adspektorisch und palpatorisch untersucht. Die Untersuchung fand in den ersten zwei Wochen nach der Operation täglich statt, ab der dritten Woche einmal wöchentlich.

Geachtet wurde hierbei auf mögliche Schwellungen und Rötungen des Operationsgebietes, ebenso auf das Verheilen der Wunde und die Hauttemperatur im Bereich der Knie. Durch Palpation wurde auf Druckempfindlichkeit und das Vorliegen von Ergüssen untersucht. Die Tiere wurden für diese Untersuchungen nicht sediert.

#### *3.1.8.3 Radiologische Kontrolle*

Als ergänzende Kontrolle wurden die Kniegelenke der Tiere 14 Tage nach der Defektdeckung geröntgt. Die Tiere wurden hierzu in Kurznarkose gelegt. Das Augenmerk lag hierbei auf Veränderungen an den Gelenkflächen, Anzeichen von Blockaden oder vermehrter Füllung der Gelenkkapsel.

#### *3.1.8.4 Serologische Kontrolle*

Die entnommenen Serumproben der Minipigs wurden im Hämatologischen Labor des Instituts für Versuchstierkunde mit Hilfe des automatischen Analysesystems Vitros 250 (Ortho Clinical Diagnostics GmbH, Johnson&Johnson GmbH, Neckarsgünd, Deutschland) auf die CRP-Konzentration untersucht. Diese Untersuchungen fanden vor der Arthroseinduktion, vor der Deckung der Läsion und vor der Euthanasie der Tiere am Versuchsende statt.

#### *3.1.9 Versuchsende*

Nach den festgesetzten Versuchszeiten von 6 Wochen, 3 Monaten bzw. 12 Monaten wurden die Tiere mit 4 mg/kg KG Azaperon, 0,044 mg/kg KG Atropinsulfat und 15 mg/kg KG Ketamin intramuskulär prämediziert. Nach Legen eines venösen Zugangs am Ohr erfolgte die Narkose mit Narcoren. Die Tiere wurden intubiert. Nach Serumgewinnung und röntgenologischer Kontrolle beider Kniegelenke wurden die Tiere in den Operationssaal gebracht, auf dem Rücken gelagert und in Narkose mit einer Überdosis Barbiturat eingeschläfert.

### 3.1.10 Postmortale Untersuchungen

#### *3.1.10.1 Makroskopische Beurteilung des Transplantats*

Beide Kniegelenke wurden unter sterilen Bedingungen wie in den vorangegangenen Operationen eröffnet und zur Dokumentation (Seitenvergleich) der Veränderung an den Gelenkflächen und des Transplantatzustandes photographiert. Die makroskopischen Veränderungen wurde anhand des modifizierten Bewertungssystems nach O`Driscoll beurteilt, das bereits im Rahmen des Vorversuchs benutzt wurde (Kapitel 3.1.3, Tabelle 3). Mittels einer oszillierenden Säge (Aesculap Oscillant, Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) wurde die gesamte Trochlea vom Knochen abgetrennt und in ein steriles Gefäß verbracht, um sie im Orthopädischen Labor weiteren Untersuchungen zu unterziehen. Die Beurteilung der histologischen Schnitte erfolgte analog zu der Beurteilung der makroskopisch sichtbaren Veränderungen mit Hilfe des modifizierten Bewertungssystems nach O`Driscoll (siehe Kapitel 3.1.3, Tabelle 3).

#### *3.1.10.2 Histologische Untersuchungen der entnommenen Knochen/Implantatproben*

Die histologische Aufarbeitung der entnommenen Knochenstücke wurde im Orthopädischen Forschungslabor (Fr. S. Steinebach, Herr Dr. K. Gavenis) durchgeführt.

Nach Entnahme wurden die Knochenstücke mit Transplantat in Ossa fixona (Fa. Waldeck GmbH & Co., Münster, Deutschland) entkalkt und fixiert. Der Vorgang des Entkalkens und Fixierens dauerte je nach Dicke des Präparates zwei bis drei Wochen. Nach erfolgter Fixation wurden die Präparate in Paraffin eingebettet und Schnitte von 3 µm Dicke angefertigt. Die Schnitte wurden so durch die Knochenstücke geführt, dass sowohl Randbereiche des Transplantates als auch das Transplantatzentrum angeschnitten wurden. Analog dazu wurden Schnitte von der Kontrollseite ohne Matrix angefertigt.

Zur histologischen Aufarbeitung wurden Hämalaun & Eosin (HE) und Safranin-O-Färbungen angefertigt. Weiterhin wurde die Produktion von Kollagen Typ-I und Kollagen Typ-II Protein immunhistochemisch bestimmt.

#### HE-Färbung:

Im ersten Schritt wurden die Schnitte mit Xylol entparaffiniert (3x 5-10 min), danach mit einer absteigenden Alkoholreihe (100 %-70 %) behandelt und mit destilliertem Wasser abgespült. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte 5-10 min in Hämalaun (Firma Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland) gefärbt und anschließend 10 min mit Leitungswasser abgespült. Darauf folgte eine 1-minütige Anfärbung in Eosinlösung (Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland). Nach Abspülen mit destilliertem Wasser wurden die gefärbten Schnitte einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %-100 %) unterzogen, der letzte Schritt erfolgte mit 100 % Isopropylalkohol. Nach einer dreimaligen (5-10 min) Behandlung mit Xylol waren die Schnitte zur Beurteilung bereit. Die Zellkerne werden in der HE-Färbung blau angefärbt, die Matrix erscheint hellrot.

#### Safranin-O-Färbung:

Analog zur HE-Färbung wurden die Schnitte mit Xylol entparaffiniert (3x 5-10 min) und mit einer absteigenden Alkoholreihe (100 %-70 %) behandelt. Die Schnitte wurden anschließend 4 h in Safranin-O-Lösung nach Flemming (100 ml 40 % Alkohol, 1g Safranin O, 50 ml Aqua dest) angefärbt. Im nächsten Schritt erfolgte analog zur HE-Färbung eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %-100 %), die mit 100 % Isopropylalkohol abgeschlossen wurde. Nach der Behandlung mit Xylol (3x 5-10min) konnten die Schnitte mikroskopisch beurteilt werden. Safranin-O färbt Chromatin hellrot, die Matrix rot und Chondrozyten mit einem hellen Hof. Kollagen wird kaum angefärbt.

#### Immunhistochemische Färbung gegen Kollagen I:

Am ersten Tag wurden die Schnitte mit Xylol dreimal entparaffiniert und nach einer absteigenden Alkoholreihe (100 %-70 %) mit PBS (Phosphate Buffered Saline: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 800 ml Aqua dest) behandelt. Danach wurden die Schnitte 5 min in 0,1 % Triton X-100 (Fluka, Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland) in PBS gegeben. Nach kurzem Tauchen in reines PBS wurden die Schnitte 10 min in eine 1:1000-Mischung aus Proteinase K und PBS überführt. Nach mehrmaliger Behandlung mit

## Eigene Untersuchungen

---

PBS, die für 10 min durch eine Lagerung in 0,3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unterbrochen wurde, wurden die Schnitte für 1 h in eine 1 % NGS (Normal Goat Serum)-Lösung (Vector, Burlingame, USA) gelegt. Über Nacht wurde bei 4 °C ein  $\alpha$ -Collagen I Antikörper aus Kaninchen (Polyclonaler Antikörper, Cedarlane, Burlington, Ontario, Canada) in einer Verdünnung von 1:750 zu den Schnitten gegeben. Am zweiten Tag wurden die Schnitte wiederholt mit PBS behandelt, um danach den zweiten Antikörper (goat-anti-rabbit-biotyniliert IgG, Vector, Burlingame, USA) in einer Konzentration von 1:200 hinzu zu geben. Nach erneuter mehrfacher Behandlung mit PBS wurde für 30 min zu den Schnitten ein ABC-Komplex, der Kaninchen-IgG enthielt, gegeben (abc-elite kit, Vector, Burlingame, USA). Die Schnitte wurden wiederum mehrmals mit PBS aufbereitet und mit DAB (Diaminobenzidin, Vector, Burlingame, USA) 5 min angefärbt. Nach einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %-100 %) und der Behandlung mit Xylol wurden die Schnitte mit DPX (Fluka, Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland) überdeckelt und standen zur Auswertung bereit.

### Immunhistochemische Färbung gegen Kollagen-II:

Die Behandlung der Schnitte zur immunhistochemischen Färbung gegen Kollagen II wurde analog zu der Färbung gegen Kollagen I durchgeführt. Der einzige Unterschied bestand in der Verwendung eines anderen ersten Antikörpers in Form eines  $\alpha$ -Collagen II Antikörpers (Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen, Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland), der in einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt wurde.

### 3.1.11 Statistik

Für die statistische Auswertung wurden Mittelwert (M) und Standardabweichung (S) berechnet. Alle Berechnungen wurden mit Hilfe elektronischer Datenverarbeitung unter Microsoft Windows XP und der Tabellenkalkulation Excel für Windows XP (Microsoft, Redmond, USA) durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm INSTAT, Version 3.0 der Firma Graph Pad, Vermont, USA.

Die stochastische Signifikanz oder Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurde mittels Student's t-test überprüft. Der t-test wurde einseitig für zwei Stichproben mit gleicher Varianz durchgeführt. Unterschiede bei einem p-Wert < 0,05 wurden als signifikant angesehen.

Die stochastische Signifikanz der Unterschiede zwischen mehr als zwei Gruppen wurde mittels Varianzanalyse (ANOVA) überprüft. Zuerst erfolgte der Bartlett's Test auf Homogenität der Varianzen und danach als post hoc Test der Tukey-Kramer Test zum multiplen Vergleich. Unterschiede bei einem p-Wert  $< 0,05$  wurden als signifikant angesehen.

### **3.2 Ergebnisse**

#### 3.2.1 Versuchstiere, Prämedikation und Narkose

Nach der Ankunft im Institut für Versuchstierkunde des Universitätsklinikums Aachen bekamen die Tiere eine mindestens einwöchige Eingewöhnungszeit. In diesen Tagen gewöhnten sich alle Tiere durch den täglichen Umgang sowohl an die neue Umgebung und neuen Haltingsbedingungen als auch an das Pflegepersonal und die Experimentatoren.

Die Eingewöhnungszeit diente gleichzeitig als Beobachtungszeit der Tiere in der Gruppe. Anhand der Beobachtungen wurde für jedes Tiere das individuelle Verhalten dokumentiert und für die spätere Beurteilung des Allgemeinbefindens nach den Operationen herangezogen. Ein Tier des 6-Wochen-Versuchs (7385) zeigte bereits während dieser Zeit ein eher zögerliches Aufsetzen der Hintergliedmaße beidseits. Zudem reagierte es auf das Personal defensiv und wurde aus diesem Grund mit 1,5 Punkten bewertet. Aus der Gruppe der Tiere des 12-Monats-Versuchs fiel bei einem Minipig (7684) ein Zurückweichen vor dem Personal auf, das sich nach der Eingewöhnungszeit nicht änderte. Dieses Tier wurde mit einem Punktwert von 1 Punkt beurteilt. Alle anderen Miniaturschweine erhielten einen Punktwert „prä OP“ von 0 Punkten.

Die Narkose wurde bei allen Minipigs wie geplant durchgeführt. Für die regelmäßigen, nicht invasiven Röntgenkontrollen wurden die Tiere nur mit Atropin, Stresnil und Ketamin betäubt, auf eine Barbituratgabe wurde verzichtet. Bei allen Tieren wurde die Narkose ohne Probleme beendet. Mit Ausnahme eines Tieres (7680) zeigten alle Tiere im Vorversuch und im Hauptversuch nach der Aufwachphase ein normales, arttypisches Verhalten. Das Minipig 7680 hatte nach der Defektdeckung mit autologen Knorpelzellen ein hochgradig reduziertes Allgemeinbefinden, Atemnot und verweigerte das Futter. Da eine erhebliche Verschlechterung des Zustandes eintrat, wurde das Tier zwei Tage später euthanasiert. Bei der durchgeführten Sektion wurden multiple Abszesse und Verwachsungen der Lunge festgestellt. Ebenso zeigte sich, dass ein Großteil der Lunge nicht mehr belüftet war und ein Herzbeutelerguß vorlag. Die histologische und zytologische Untersuchung des im Institut für Pathologie (Universitätsklinikum Aachen) untersuchten Lungengewebes ergab eine schwere Bronchopneumonie, ein Lungenödem, eine chronische Lymphadenitis und Sinushistozytose.

### 3.2.2 Vorversuch

In Rahmen des Vorversuchs wurde sechs Tieren in Narkose Chymopapain in das rechte Kniegelenk oder in beide Kniegelenke injiziert (siehe 3.1.3). In der postoperativen Beobachtungsphase wurde bei allen Tieren ein arttypisches Verhalten beobachtet, das auch dem zuvor festgestellten individuellen Verhaltensmuster entsprach. Nach einer Standzeit von 8-12 Wochen wurden die Tiere euthanasiert und die Kniegelenke auf arthrotische Veränderungen untersucht.

#### 3.2.2.1 Makroskopische Befunde

Bei keinem der sechs Tiere wurden Merkmale einer großflächigen Arthrose festgestellt. Das makroskopische Erscheinungsbild der Trochlea eines unbehandelten Kniegelenks ist zum Vergleich in Abbildung 7 dargestellt.

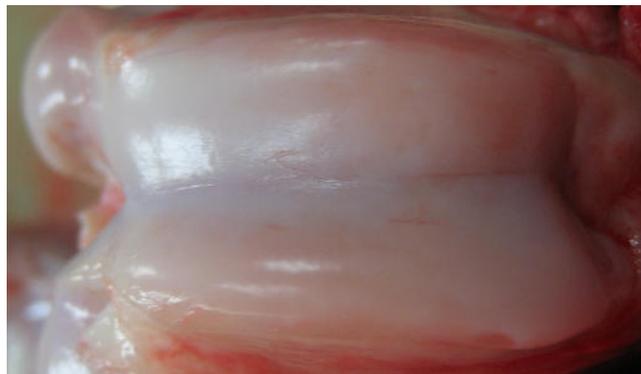


Abbildung 7: Trochlea der unbehandelten Kontrollseite

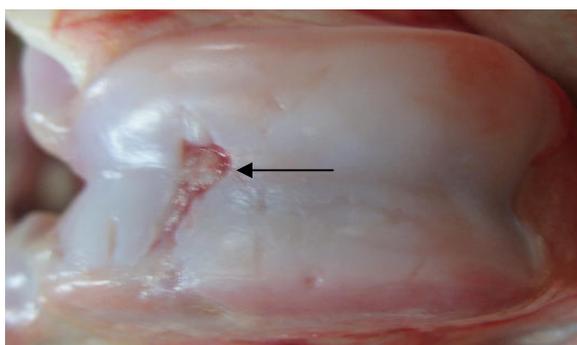
Bei der Gruppe, der zweimal 100 U Chymopapain in beide Kniegelenke injiziert worden waren, wurde makroskopisch an vereinzelt Stellen der Trochlea eine geringgradige Unebenheit beziehungsweise Rauigkeit der Knorpeloberfläche diagnostiziert (Abbildung 8).



Abbildung 8: Makroskopische Veränderungen an der Trochlea nach zweimaliger Gabe von 100 U Chymopapain, (Tier 7696 links). Die Veränderungen finden sich in Form von geringgradigen Unebenheiten beziehungsweise Rauigkeiten (siehe Umkreisung).

In den Kniegelenken, die mit 500 bzw. 1000 U behandelt worden waren, wurden tiefer gehende Defekte im rechten Kniegelenk festgestellt (Abbildung 9). Diese Defekte waren lokal begrenzt und befanden sich an unterschiedlichen Stellen der Gelenkfläche. Bei den Tieren, denen 1000 U Chymopapain in das rechte Kniegelenk injiziert worden waren, zeigte sich an der Trochlea zudem eine Rauigkeit der Knorpeloberfläche.

A



B

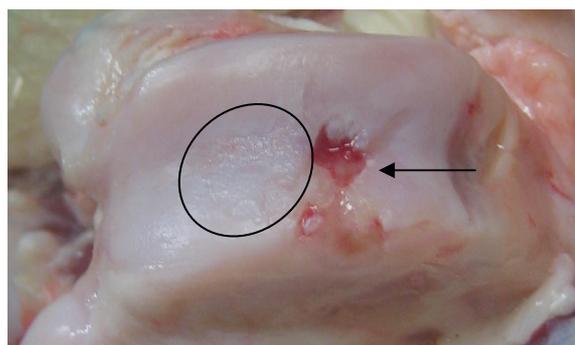


Abbildung 9: Makroskopische Veränderungen an der Trochlea nach 500 U (A) und 1000 U (B) Chymopapain. Sowohl in der Gruppe, die mit 500 U (Tier 7682 rechts) behandelt wurde, als auch in der Gruppe mit 1000 U (Tier 7686 rechts) finden sich lokal begrenzte, tiefer gehende Defekte (siehe Pfeil). Zusätzlich ist an der Trochlea des mit 1000 U Chymopapain behandelten Kniegelenks eine Rauigkeit der Oberfläche zu sehen (umkreist).

Die Klassifizierung der makroskopischen Veränderungen an der Trochlea mittels des modifizierten Bewertungssystems nach O'Driscoll findet sich in Tabelle 5. Die Gesamtpunktzahlen der Knie, die mit zweimal 100 U Chymopapain behandelt worden waren, liegen zwischen 9 und 13 Punkten. In der Gruppe mit 500 U Chymopapain liegen die Gesamtpunkte bei Werten von 12 und 13, in der Gruppe mit 1000 U Chymopapain bei 11 und 12 Punkten. Die Kontrollknie wurden alle mit einem Gesamtpunktwert von 14 bewertet, was der zu erreichenden Gesamtsumme entspricht.

Eigene Untersuchungen

Tabelle 5: Makroskopische Veränderungen des Knorpels an der Trochlea nach Behandlung mit 2x 100 U, 500 U und 1000 U Chymopapain (modifiziert nach O'Driscoll et al. 1986).

<b>Kniegelenk</b>		<b>7688 li</b>	<b>7688 re</b>	<b>7696 li</b>	<b>7696 re</b>	<b>7678 li</b>	<b>7678 re</b>	<b>7682 li</b>	<b>7682 re</b>	<b>7685 li</b>	<b>7685 re</b>	<b>7686 li</b>	<b>7686 re</b>
<b>Chymopapain- Injektion</b>		<b>2x 100 U</b>	<b>2x 100 U</b>	<b>2x 100 U</b>	<b>2x 100 U</b>	<b>-</b>	<b>500 U</b>	<b>-</b>	<b>500 U</b>	<b>-</b>	<b>1000 U</b>	<b>-</b>	<b>1000 U</b>
Adhäsionen	(1) ja (2) nein	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	n. d. <sup>1</sup>	2
Randleiste	(1) kein Bonding (2) partielles Bonding (3) vollständiges Bonding	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	n. d.	3
Oberfläche	(1) zerfurcht (2) rau (3) glatt	2	1	2	2	3	2	3	3	3	2	n. d.	2
Kontur	(1) vertieft (2) erhöht (3) auf gleicher Höhe	1	1	3	3	3	3	3	1	3	3	n. d.	1
Regenerat (im Vergleich zum um- liegenden Knorpel)	(1) weich (2) härter (3) gleich	3	2	3	3	3	3	3	3	3	2	n. d.	3
<b>Gesamt</b>		<b>11</b>	<b>9</b>	<b>13</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>12</b>	<b>14</b>	<b>12</b>	<b>n. d.</b>	<b>11</b>

<sup>1</sup>n. d.: nicht durchgeführt, da kein Probenmaterial vorhanden

### 3.2.2.2 Histologische Befunde

Der physiologische Befund der histologischen Untersuchung ist anhand eines unbehandelten Knies in Abbildung 10 dargestellt.

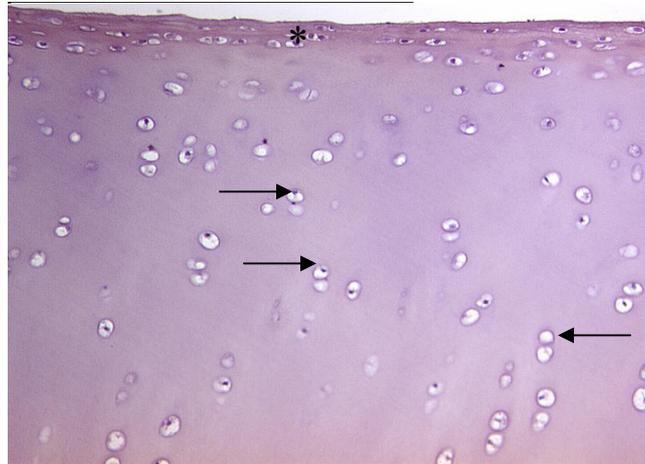


Abbildung 10: Histologischer Schnitt der Kontrollseite ohne Chymopapaininjektion (HE-Färbung): An der Oberfläche (\*) zeigt sich die für Chondrozyten typische Anordnung. Die Zellen nehmen hierbei eine flache Form an. In darunter liegenden Schichten haben die Chondrozyten (siehe Pfeil) eine noch runde Form und weisen eine zonale Ausrichtung auf.

Die Auswertung der histologischen Schnitte der Kniegelenke, die mit 2x 100 U Chymopapain behandelt worden waren, zeigte folgende Veränderungen: Festzustellen war bei Tier 7688 im linken Kniegelenk eine Reduzierung der Chondrozyten an der Knorpeloberfläche (Abbildung 11), bei Tier 7696 wurden lokal geringe (links) bis schwere (rechts) Fissuren der Oberfläche diagnostiziert - kombiniert mit leichten Fissuren unter der Oberfläche. Beide Befunde stellen keine Veränderungen im Sinne einer großflächigen, massiven Schädigung des Knorpels dar.

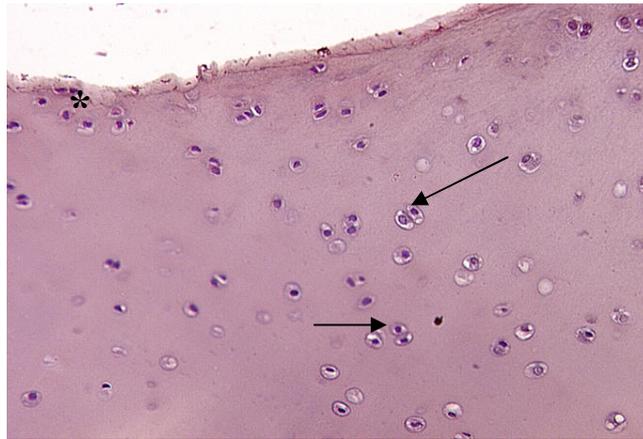


Abbildung 11: Histologischer Schnitt nach Injektion von 100 Chymopapain, linkes Kniegelenk des Minipigs 7688 (HE- Färbung). Es zeigt sich deutlich die typische runde Form der Chondrozyten (siehe Pfeil), wobei an der Oberfläche nur vereinzelt flache Knorpelzellen (\*) zu sehen sind.

In der Gruppe, der 500 U Chymopapain in das Kniegelenk injiziert worden waren, wurden an den behandelten Kniegelenken ebenfalls keine Veränderungen im Sinne einer großflächigen Arthrose diagnostiziert. Bei Tier 7678 wurden sowohl das behandelte Kniegelenk als auch die Kontrollseite mit 17 Punkten bewertet, das heißt, es gab histologisch keine Veränderungen durch Chymopapain im Vergleich zum unbehandelten Kniegelenk (Abbildung 12). Bei Minipig 7682 zeigten sich an der Oberfläche geringe Fissuren, die sich auch unterhalb des oberflächlichen Gewebes fortsetzten. Des Weiteren wurde eine partielle Vertiefung des Knorpels zum umliegenden Knorpelgewebe festgestellt.

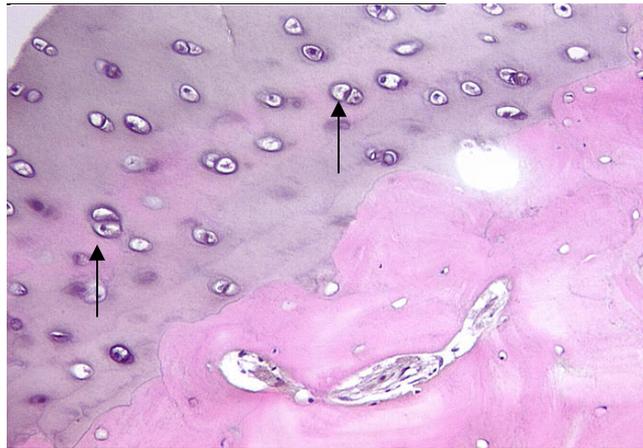


Abbildung 12: Histologischer Schnitt nach Injektion von 500 U Chymopapain, rechtes Kniegelenk des Minipigs 7678 (HE-Färbung). Die Chondrozyten (↑) sind analog zu den physiologischen Begebenheiten von runder Form und zeigen eine zonale Ausrichtung.

Bei den Minipigs, deren rechtes Kniegelenk mit 1000 U Chymopapain behandelt worden war, wurden folgende Veränderungen festgestellt: Bei Tier 7685 zeigten sich auf der Kontrollseite wenig Kollagen II und geringe Fissuren der Oberfläche. Bei der behandelten Seite fielen zusätzlich vorwiegend fibröses Gewebe, Fissuren unter der Oberfläche und Vertiefungen des Knorpels im Vergleich zum umliegenden Gewebe auf (Abbildung 13). Der Knorpel des rechten Kniegelenks des Minipigs 7686 wies einen geringen Anteil an Kollagen II auf.

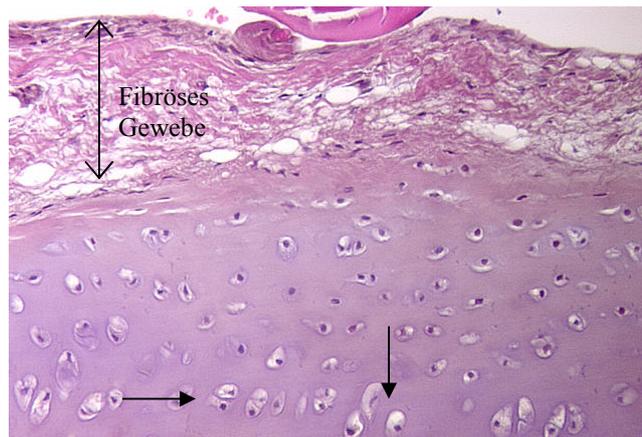


Abbildung 13: Histologischer Schnitt nach Injektion von 1000 U Chymopapain (HE Färbung), rechtes Kniegelenk des Minipigs 7685. Die Knorpelzellen weisen in den tiefer gelegenen Regionen des Knorpels eine annähernd runde Form auf, die zonale Ausrichtung ist vorhanden (siehe Pfeil). An der Oberfläche befindet sich überwiegend fibröses Gewebe.

Die Klassifizierung der histologisch festgestellten Veränderungen des Gelenkknorpels, beurteilt nach dem modifizierten Bewertungssystem nach O'Driscoll, ist in der Tabelle 6 dargestellt. Die Gesamtpunktzahlen der Knie, die mit zweimal 100 U Chymopapain behandelt worden waren, liegen zwischen 13 und 17 Punkten. In der Gruppe mit 500 U Chymopapain liegen die Gesamtpunkte bei Werten von 13 und 17, in der Gruppe mit 1000 U Chymopapain bei 10 und 17 Punkten. Die Kontrollknie wurden in zwei Fällen mit 17 Punkten, in einem Fall mit 15 Punkten bewertet.

Bei der Auswertung der makroskopischen und histologischen Befunde des Vorversuchs wurden keine durch Chymopapain induzierten arthrotischen Veränderungen des Gelenkknorpels in dem gewünschten Maß festgestellt. Aus diesem Grund erfolgte die Arthroseinduzierung im Hauptversuch mittels mechanischer Entfernung des Knorpels.

Tabelle 6: Histologische Veränderungen des Knorpels an der Trochlea nach Behandlung mit 2x 100 U, 500 U und 1000 U Chymopapain (modifiziert nach O'Driscoll et al.1986)

<b>Kniegelenk</b>		<b>7688 li</b>	<b>7688 re</b>	<b>7696 li</b>	<b>7696 re</b>	<b>7678 li</b>	<b>7678 re</b>	<b>7682 li</b>	<b>7682 re</b>	<b>7685 li</b>	<b>7685 re</b>	<b>7686 li</b>	<b>7686 re</b>
<b>Chymopapain- Injektion</b>		<b>2x 100 U</b>	<b>2x 100 U</b>	<b>2x 100 U</b>	<b>2x 100 U</b>	<b>-</b>	<b>500 U</b>	<b>-</b>	<b>500 U</b>	<b>-</b>	<b>1000 U</b>	<b>-</b>	<b>1000 U</b>
Gewebebeschaffenheit	(1) fibrös (2) wenig differenzierter Knorpel (3) hyalinartig	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	n. d. <sup>2</sup>	3
Oberflächenregularität	(1) schwere Fibrillationen/Fissuren (2) geringe Fibrillationen/Fissuren (3) intakte Oberfläche	3	3	1	2	3	3	3	2	2	2	n. d.	3
Strukturelle Integrität (unterhalb der Ober- fläche)	(1) schwere durchgehende Fissu- ren/Spalt (2) geringe Fissuren (3) intakt	3	3	2	3	3	3	3	2	3	2	n. d.	3
Verbindung zur Knor- pelschulter	(1) kein Bonding (2) partielles Bonding (3) vollständiges Bonding	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	n. d.	3
Höhe des Regenerats (im Vergleich zum umliegenden Knorpel)	(1) vertieft (2) erhöht (3) auf gleicher Höhe	3	3	2	3	3	3	3	1	3	1	n. d.	3
Kollagen II	(1) wenig (2) mittel (3) hoch	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	n. d.	2
	<b>Gesamt</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>13</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>17</b>	<b>17</b>	<b>13</b>	<b>15</b>	<b>10</b>	<b>n. d.</b>	<b>17</b>

<sup>2</sup> n. d.: nicht durchgeführt, da kein Probenmaterial vorhanden

### 3.2.3 Hauptversuch

In dem darauf folgenden Hauptversuch wurde bei 22 (18 + 4) Tieren mechanisch eine Arthrose in beiden Kniegelenken induziert. Bei allen Tieren wurde der Knorpel im geplanten Maß abradiert (siehe 3.1.4).

Nach 14 Tagen wurde den Tieren das autologe Chondrozytentransplantat im Rahmen einer zweiten Operation in das rechte Kniegelenk implantiert. Das linke Knie, in das keine Chondrozytenmatrix implantiert wurde, diente als Kontrolle. Alle Tiere konnten erfolgreich operiert werden. Nach Transplantation kam es bei vier Tieren zu Komplikationen, welche eine vorzeitige Euthanasie der Tiere nach sich zogen. Für diese vier Minipigs wurden Ersatztiere beantragt.

### 3.2.4 Postoperativer Verlauf

Postoperativ wurden alle Tiere mit Analgetika und Antibiotika behandelt. Das Analgetikum Carprofen wurde den Tieren per os verabreicht und von diesen gut aufgenommen.

Der individuelle Heilungsverlauf wurde anhand intensiver Beobachtung, unter Verwendung der numerischen Verhaltens- und Schmerztabelle (siehe Tabelle 4, Kapitel 3.1.8.1), dokumentiert. Der beste zu erreichende Punktwert beträgt 0 Punkte, der schlechteste Punktwert 15 Punkte.

#### 3.2.4.1 Verlauf nach Abrasion:

##### Tiere des 6-Wochen-Versuchs:

In der Gruppe der Tiere mit einer Beobachtungszeit von 6 Wochen zeigten drei Tiere (7693, 7385, 1604) keine Veränderung des Allgemeinbefindens. Drei Tiere (7679, 7680, 7681) zeigten in den ersten zwei beziehungsweise drei Tagen nach der Abrasion eine geringgradige Lahmheit beidseits. Zwei Minipigs (7690 und 7691) zeigten an zwei beziehungsweise drei Tagen eine reduzierte Aktivität. Ein Tier (7687) zeigte am 5. und 6. postoperativen Tag eine geringgradige Lahmheit. Das zehnte Tier des 6-Wochen-Versuchs (7675) lahmt ab dem 4. Tag nach der Operation bis zum 7. Tag geringgradig, zwischen dem 8. und 10. postoperativen Tag deutlich. Zusätzlich zeigte das Tier vom 5.-7. Tag Bewegungsunlust und geringe Neu-

gierde (Tabelle 7). Die Bewertung von 1,5 Punkten bei Minipig 7385 ergibt sich aus der präoperativen Beobachtungs- und Bewertungsphase (siehe 3.2.1). Die Mittelwerte aller Tiere des 6-Wochen-Versuchs sind in Abbildung 14 dargestellt.

Tabelle 7: Summe der täglichen Bewertungspunkte der Tiere des 6-Wochen-Versuchs vor Defektinduktion und an den Tagen 1-10 post OP.

<b>Tier</b>	<b>7679</b>	<b>7680</b>	<b>7681</b>	<b>7690</b>	<b>7691</b>	<b>7693</b>	<b>7385</b>	<b>1604</b>	<b>7675</b>	<b>7687</b>
<b>präOP</b>	0	0	0	0	0	0	1,5	0	0	0
<b>OP-1</b>	1	1	1	1	1	0	1,5	0	0	0
<b>d 1</b>	1	1	1	1	1	0	1,5	0	0	0
<b>d 2</b>	1	1	1	1	1	0	1,5	0	0	0
<b>d 3</b>	1	1	0	1	0	0	1,5	0	0	0
<b>d 4</b>	0	0	0	0	0	0	1,5	0	1	0
<b>d 5</b>	0	0	0	0	0	0	1,5	0	3	1
<b>d 6</b>	0	0	0	0	0	0	1,5	0	3	1
<b>d 7</b>	0	0	0	0	0	0	1,5	0	3	0
<b>d 8</b>	0	0	0	0	0	0	1,5	0	2	0
<b>d 9</b>	0	0	0	0	0	0	1,5	0	2	0
<b>d 10</b>	0	0	0	0	0	0	1,5	0	2	0

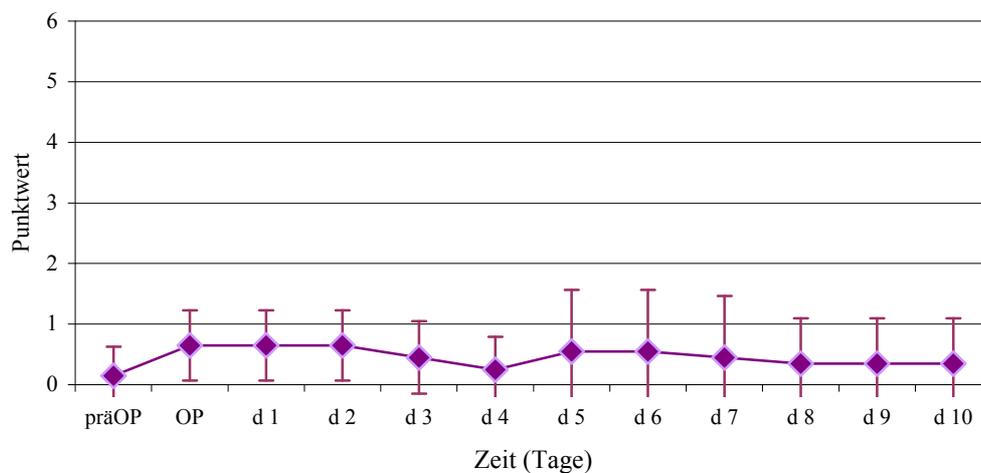


Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf des Allgemeinbefindens aller Tiere des 6-Wochen-Versuchs nach Defektinduktion (OP) (Mittelwert mit Standardabweichung). präOP: vor Beginn des Versuchs.

### Tiere des 3-Monats-Versuchs:

Bei den Tieren mit einer Beobachtungszeit von 3 Monaten zeigten drei Minipigs (4028, 4029, 7673) keine Veränderungen des Allgemeinbefindens. Ein Minipig (7534) lahmt am 6. postoperativen Tag geringgradig links, ein weiteres (7535) vom 4.-6. Tag nach Defektinduktion geringgradig rechts. Das sechste Tier des 3-Monats-Versuchs (7677) wies direkt nach der Abrasion 3 Tage eine geringgradige Lahmheit beidseits auf, am 8. und 9. postoperativen Tag eine geringgradige Lahmheit links (Tabelle 8). In Abbildung 15 sind die Bewertungspunkte der Tage 1-10 nach Abrasion als täglicher Mittelwert mit Standardabweichung aller Tiere mit einer Beobachtungszeit von 3 Monaten dargestellt.

Tabelle 8: Summe der täglichen Bewertungspunkte der Tiere des 3-Monats-Versuchs vor Defektinduktion und an den Tagen 1-10 post OP.

Tier	4028	4029	7534	7535	7673	7677
<b>präOP</b>	0	0	0	0	0	0
<b>OP-1</b>	0	0	0	0	0	1
<b>d 1</b>	0	0	0	0	0	1
<b>d 2</b>	0	0	0	0	0	1
<b>d 3</b>	0	0	0	0	0	1
<b>d 4</b>	0	0	0	1	0	0
<b>d 5</b>	0	0	0	1	0	0
<b>d 6</b>	0	0	1	1	0	0
<b>d 7</b>	0	0	0	0	0	0
<b>d 8</b>	0	0	0	0	0	1
<b>d 9</b>	0	0	0	0	0	1
<b>d 10</b>	0	0	0	0	0	0

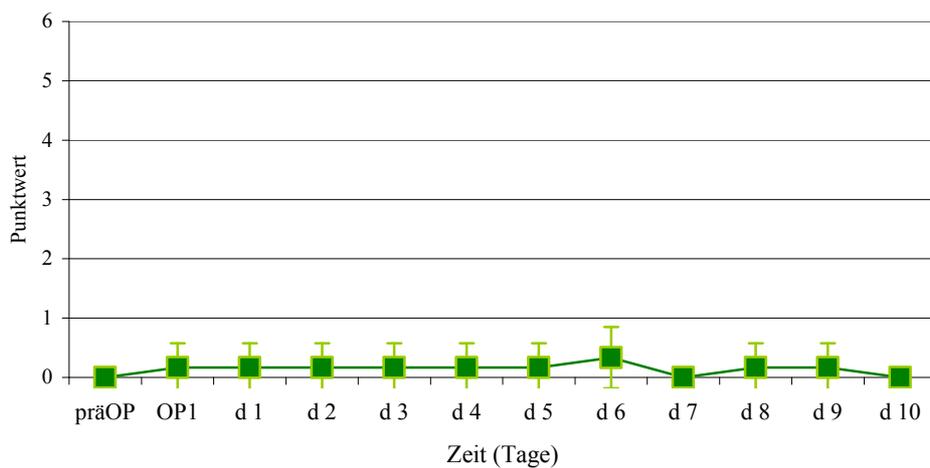


Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf des Allgemeinbefindens aller Tiere des 3-Monats-Versuchs nach Defektinduktion (OP) (Mittelwert mit Standardabweichung). präOP: vor Beginn des Versuchs.

## Eigene Untersuchungen

### Tiere des 12-Monats-Versuchs:

Zwei Tiere des 12-Monats-Versuchs (4032, 7683) zeigten am ersten postoperativen Tag eine geringgradige Lahmheit beidseits. Zwei weitere (4030, 7689) lahmten an den ersten beiden postoperativen Tagen geringgradig beidseits. Bei Minipig 4031 wurde am ersten Tag nach der Defektinduktion eine deutliche Lahmheit festgestellt, die sich am zweiten Tag zu einer geringgradigen Lahmheit verringerte. Ab dem dritten postoperativen Tag zeigte das Tier ein normales Belasten der Gliedmaße. Das Minipig 7684 lahmt nach der Defektinduktion bis zur Defektdeckung beidseits deutlich. Die Bewertung des Tieres mit 3 Punkten resultiert aus der präoperativen Beurteilung von 1 Punkt (Tabelle 9). Die Mittelwerte der täglichen Bewertungspunktesummen aller Tiere des 12-Monats-Versuchs sind in Abbildung 16 dargestellt.

Tabelle 9: Summe der täglichen Bewertungspunkte der Tiere des 12-Monats-Versuchs vor Defektinduktion und an den Tagen 1-10 post OP.

<b>Tier</b>	<b>4030</b>	<b>4031</b>	<b>4032</b>	<b>7683</b>	<b>7684</b>	<b>7689</b>
<b>präOP</b>	0	0	0	0	1	0
<b>OP-1</b>	1	2	1	1	1	1
<b>d 1</b>	1	2	1	1	3	1
<b>d 2</b>	1	1	0	0	3	1
<b>d 3</b>	0	0	0	0	3	0
<b>d 4</b>	0	0	0	0	3	0
<b>d 5</b>	0	0	0	0	3	0
<b>d 6</b>	0	0	0	0	3	0
<b>d 7</b>	0	0	0	0	3	0
<b>d 8</b>	0	0	0	0	3	0
<b>d 9</b>	0	0	0	0	3	0
<b>d 10</b>	0	0	0	0	3	0

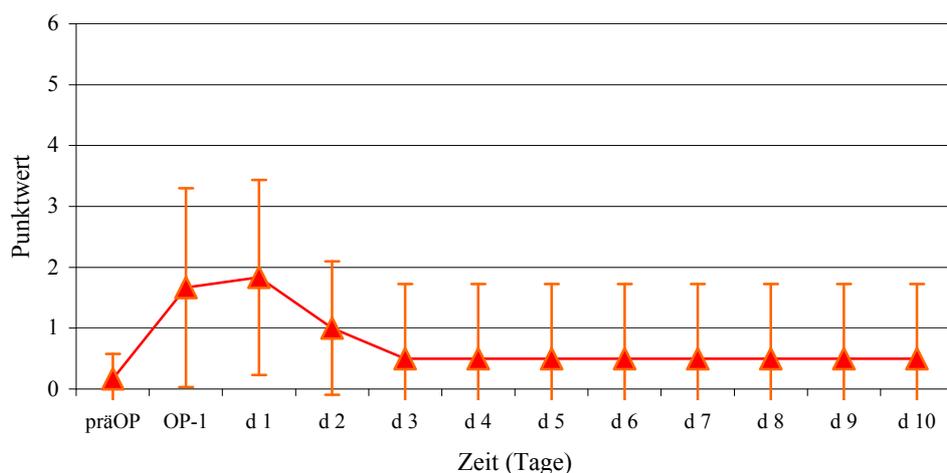


Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf des Allgemeinbefindens aller Tiere des 12-Monats-Versuchs nach Defektinduktion (OP-1) (Mittelwert mit Standardabweichung). präOP: Verhalten vor Beginn des Versuchs.

In Abbildung 17 ist die Häufigkeit der vergebenen Bewertungspunkte nach der Defektsetzung als prozentualer Anteil an allen vorgenommenen Bewertungen bei den 22 eingesetzten Tieren nach der ersten Operation dargestellt.

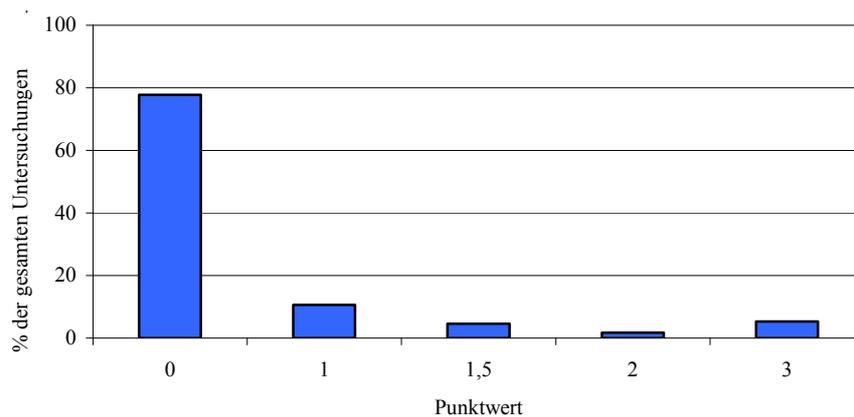


Abbildung 17: Prozentuale Verteilung der vergebenen Punktwerte bei Bewertung des Allgemeinbefindens und der Schmerzintensität der 22 Tiere des Hauptversuchs nach Abrasion bis zur 2. Operation.

### 3.2.4.2 *Verlauf nach Deckung der Läsion: Tag 1-10:*

Um einen besseren Überblick über die Zeit direkt nach der Transplantation und dem längerfristigen Verlauf zu bekommen, wird die Zeit nach der zweiten Operation in zwei Bereiche aufgeteilt: Tag 1-10 und Tag 11-Ende.

#### Tiere des 6-Wochen-Versuchs:

Das Tier 7679 lahmt ab dem 1. Tag nach der Defektdeckung deutlich mit der rechten Gliedmaße, die von Tag 7 bis 9 teilweise und an Tag 10 vollständig entlastet wurde. Zwischen dem 5. und 9. Tag wurde zudem eine reduzierte Aktivität beobachtet. Ab dem 7. postoperativen Tag verweigerte das Tier die Futtermaufnahme vollständig und wich dem Untersucher aus. Zudem traten ab dem 9. Tag verminderte Neugier und Bewegungsunlust auf. Das Minipig 7680 zeigte in den ersten beiden Tagen nach der Defektdeckung keine Aktivität bis hin zu Apathie, lag gesondert und verweigerte die Futtermaufnahme vollständig. Beide Beine wurden nicht belastet und auf Annähern oder Berührung reagierte das Tier mit verstärkten Lautäußerungen, ausgeprägtem Abwehrverhalten und Aggression. Begleitet wurde der Zustand des Tieres von einer erhöhten Atemfrequenz und einem gelegentlichen Zähneknirschen. Am 2. Tag nach Deckung der Läsion betrug die Bewertung 15 Punkte. Das Tier 7681 zeigte zwischen dem 1. und 5. postoperativen Tag eine deutliche Lahmheit rechts, die sich bis zu Tag 8 zu einer normalen Belastung der Gliedmaße entwickelte. Am 3. und 4. postoperativen Tag verhielt es sich dem Untersucher gegenüber ausweichend. Vom 4. bis 6. postoperativen Tag verweigerte es das Futter vollständig, fraß aber an den zwei darauffolgenden Tagen wieder verhalten. Ein Minipig (7690) zeigte vom 1. Tag bis zum 8. Tag nach der Defektdeckung eine reduzierte Aktivität, die sich am 9. und 10. Tag zu geringer Neugier und Bewegungsunlust entwickelte. An den ersten 5 Tagen nach Defektdeckung entlastete das Tier die rechte Gliedmaße zeitweise, mit Phasen der totalen Entlastung, ab dem 6. Tag wurde die rechte Gliedmaße nicht mehr belastet. Am 6. und 7. postoperativen Tag nahm das Minipig kein Futter auf und zeigte für 4 Tage ein Ausweichen vor dem Untersucher.

Zwei Minipigs (7691, 7693) zeigten am ersten beziehungsweise zweiten Tag eine geringgradige Lahmheit rechts. Das Minipig 7385 lahmt in den ersten drei Tagen nach der Defektdeckung geringgradig. Der in Tabelle 10 aufgezeichnete Punktwert von 2,5 Punkten resultiert aus dem ausweichenden Verhalten gegenüber den Untersuchern, das schon während der Beo-

bachtungsphase registriert wurde. Ein Tier (1604) zeigte keine Veränderung des Allgemeinbefindens. Das Tier 7675, das vor der Defektdeckung bereits einen Punktwert von 2 Punkten hatte, lahmt deutlich bis zum 10. postoperativen Tag, kombiniert mit einer reduzierten Aktivität beziehungsweise Bewegungsunlust an den ersten drei postoperativen Tagen. Ein Tier des 6-Wochen-Versuchs (7687) zeigte vom 1. bis 3. Tag nach der Deckung des Defektes eine deutliche Lahmheit, die sich ab dem 4. Tag zu einer geringgradigen Lahmheit entwickelte (Tabelle 10). Die Mittelwerte der täglichen Bewertungspunktsomme von „Tag 1-10 postOP-2“ aller Tiere des 6-Wochen-Versuchs sind in Abbildung 18 dargestellt.

Tabelle 10: Summe der täglichen Bewertungspunkte der Tiere des 6-Wochen-Versuchs vor Defektdeckung und an den Tagen 1-10 danach

<b>Tier</b>	<b>7679</b>	<b>7680</b>	<b>7681</b>	<b>7690</b>	<b>7691</b>	<b>7693</b>	<b>7385</b>	<b>1604</b>	<b>7675</b>	<b>7687</b>
<b>präOP-2</b>	0	0	0	0	0	0	1,5	0	2	0
<b>OP-2</b>	2	2	2	4,5	1	1	2,5	0	4	2
<b>d 1</b>	2	13	2	4,5	1	1	2,5	0	4	2
<b>d 2</b>	2	15	2	4,5	1	0	2,5	0	4	2
<b>d 3</b>	2	E <sup>3</sup>	3	4,5	0	0	2,5	0	4	2
<b>d 4</b>	2	E	5	4,5	0	0	1,5	0	3	1
<b>d 5</b>	3	E	4	7	0	0	1,5	0	3	1
<b>d 6</b>	3	E	3	8	0	0	1,5	0	3	1
<b>d 7</b>	7	E	2	6	0	0	1,5	0	3	1
<b>d 8</b>	7	E	1	7	0	0	1,5	0	3	1
<b>d 9</b>	7	E	0	7	0	0	1,5	0	3	1
<b>d 10</b>	8	E	2	7	0	0	1,5	0	3	1

<sup>3</sup>E: Euthanasie (siehe 3.2.5)

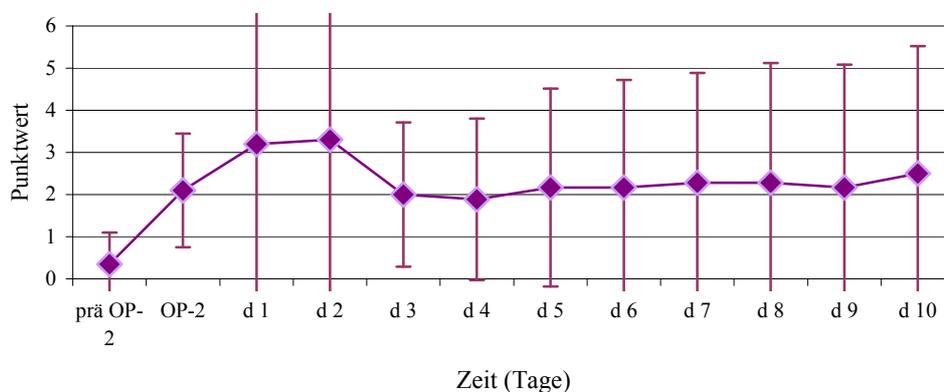


Abbildung 18: Zeitlicher Verlauf des Allgemeinbefindens aller Tiere des 6-Wochen-Versuchs, Tag 1-10 nach der Defektdeckung (OP-2) (Mittelwert mit Standardabweichung). präOP-2: Verhalten vor der zweiten Operation

### Tiere des 3-Monats-Versuchs:

Das Minipig 4028 lahmte vom 1. bis 5. postoperativen Tag geringgradig rechts. Das Tier 4029 zeigte zwischen dem 1. und 7. Tag nach Deckung der Läsion eine geringgradige Lahmheit rechts, die am 8. bis 10. Tag zu einer deutlichen Lahmheit wurde. Bei zwei Tieren (7534, 7535) konnten keine Veränderungen des Allgemeinbefindens festgestellt werden. Ein Tier (7673) zeigte in den ersten beiden Tagen nach der Operation eine geringgradige Lahmheit rechts, ab dem 3. Tag wurde die Gliedmaße wieder normal belastet. Das Minipig 7677 fiel in den ersten 10 Tagen nach der Defektdeckung durch eine geringgradige Lahmheit der rechten Gliedmaße auf, die an den Tagen 5 und 6 Tendenzen einer deutlichen Lahmheit trug (Tabelle 11). Die Mittelwerte der täglichen Summen sind zur Wiedergabe des postoperativen Verlaufs in Abbildung 19 dargestellt.

Tabelle 11: Summe der täglichen Bewertungspunkte der Tiere des 3-Monats-Versuchs vor Defektdeckung und an den Tagen 1-10 danach

Tier	4028	4029	7534	7535	7673	7677
<b>präOP-2</b>	0	0	0	0	0	0
<b>OP-2</b>	1	1	0	0	1	1
<b>d 1</b>	1	1	0	0	1	1
<b>d 2</b>	1	1	0	0	1	1
<b>d 3</b>	1	1	0	0	0	1
<b>d 4</b>	1	1	0	0	0	1
<b>d 5</b>	1	1	0	0	0	2
<b>d 6</b>	0	1	0	0	0	2
<b>d 7</b>	0	1	0	0	0	1
<b>d 8</b>	0	2	0	0	0	1
<b>d 9</b>	0	2	0	0	0	1
<b>d 10</b>	0	2	0	0	0	1

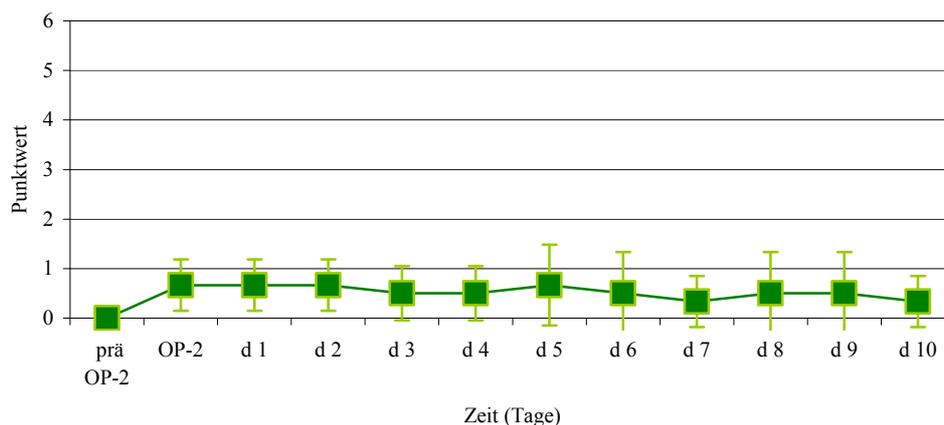


Abbildung 19: Zeitlicher Verlauf des Allgemeinbefindens aller Tiere des 3-Monats-Versuchs, Tag 1-10 nach der Defektdeckung (OP-2) (Mittelwert mit Standardabweichung). präOP-2: Verhalten vor der zweiten Operation.

### Tiere des 12-Monats-Versuchs:

Das Minipig 4030 lahmt am ersten Tag nach Deckung des Knorpeldefektes geringgradig, in den Tagen 2-6 „post OP-2“ wurde eine deutliche Lahmheit dokumentiert, die ab Tag 7 in eine geringgradige Lahmheit abnahm. Am 3.-5. postoperativen Tag zeigte das Minipig eine geringe Neugier und Bewegungsunlust, die sich am 6. Tag zu einer reduzierten Aktivität verbesserte. Zwei Tiere (4031, 4032) zeigten an Tag 1 und 2 postoperativ eine geringgradige Lahmheit. Bei Minipig 7683 konnte keine Veränderung des Allgemeinbefindens festgestellt werden. Ein Tier (7684) entlastete zeitweise die rechte Gliedmaße vom 1. bis 10. Tag nach der Defektdeckung. Weiter war es am 1.Tag vermindert aktiv. In den folgenden 6 Tagen zeigten sich Bewegungsunlust und geringe Neugier, die am 4. Tag die Tendenz zu fehlender Kontaktaufnahme und Absondern von der Gruppe trugen. Ab dem 7. Tag verbesserte sich die Aktivität des Tieres. An den ersten 4 Tagen war zudem eine verstärkte Vokalisation und Aggression bei Kontaktaufnahme oder Berührung durch den Untersucher. Ab dem 5. Tag kam es zu einer Besserung des provozierten Verhaltens. Zwischen dem 7. und 10. Tag nach Deckung des Knorpeldefektes wurde eine gestörte Futteraufnahme beobachtet. Nach einer deutlichen Lahmheit in den ersten sechs Tagen lahmt das Tier 7689 von Tag 7-10 geringgradig (Tabelle 12). Die aus den Tagessummen errechneten Mittelwerte finden sich in Abbildung 20.

Tabelle 12: Summe der täglichen Bewertungspunkte der Tiere des 12-Monats-Versuchs vor Defektdeckung und an den Tagen 1-10 danach

Tier	4030	4031	4032	7683	7684	7689
präOP-2	0	0	0	0	3	0
OP-2	1	1	0	0	3	0
d 1	1	1	1	0	7	1
d 2	2	1	1	0	8	1
d 3	4	0	0	0	8	1
d 4	4	0	0	0	9	1
d 5	4	0	0	0	6	1
d 6	3	0	0	0	6	1
d 7	1	0	0	0	6	1
d 8	1	0	0	0	7	1
d 9	1	0	0	0	6	1
d 10	1	0	0	0	6	1

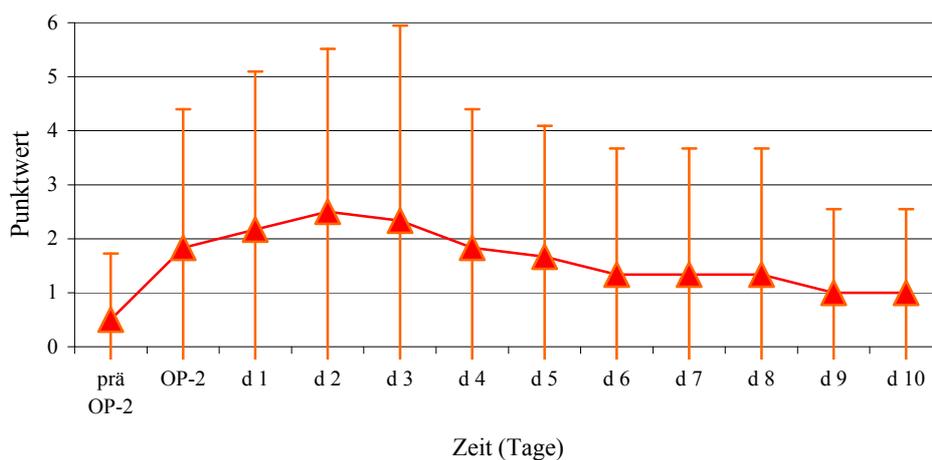


Abbildung 20: Zeitlicher Verlauf des Allgemeinbefindens aller Tiere des 12-Monats-Versuchs, Tag 1-10 nach der Defektdeckung (OP-2) (Mittelwert mit Standardabweichung). präOP-2: Verhalten vor der zweiten Operation.

### 3.2.4.3 *Verlauf nach Deckung der Läsion: Tag 11 bis Versuchende*

#### Tiere des 6-Wochen-Versuchs:

Das Tier 7679 belastete an den Tagen 11-13 nach der Defektdeckung die rechte Gliedmaße nicht mehr und lag überwiegend. Zudem bestand weiterhin eine Verweigerung des Futters, die zwischenzeitlich zu einer verhaltenen Futteraufnahme wechselte. Ein Zurückweichen vor dem Untersucher wurde permanent beobachtet. An den Tagen 12 und 13 hatte das Tier eine erhöhte Atemfrequenz entsprechend einem Punktwert von 1 Punkt. Am 14. Tag verschlechterte sich das Allgemeinbefinden auf einen Punktwert von 11 Punkten. Das Tier 7681 zeigte zwischen dem 12. und 15. postoperativen Tag eine deutliche Lahmheit rechts, die sich zu einem zeitweise auftretenden Entlasten der Gliedmaße entwickelte. Neben einer geringen Neugierde und Bewegungsunlust wurde ein ausgeprägtes Fluchtverhalten des Tieres beobachtet. An den Tagen 14 und 15 nach Defektdeckung traten gelegentliches Zähneknirschen und eine erhöhte Atemfrequenz von über 25 Atemzügen pro Minute auf. Am 15. postoperativen Tag erhielt das Tier einen Punktwert von 10 Punkten. Das Verhalten des Tieres 7690 zwischen dem 1. und 10. Tag (reduzierte Aktivität, Bewegungsunlust, zeitweise totale Entlastung der Gliedmaße) setzte sich am 11. Tag gleichermaßen fort. Am 12. und 13. Tag nach der Defektdeckung hatte das Minipig eine erhöhte Atemfrequenz. Durch die zusätzlich am 13. Tag auftretende vollständige Futtermittelverweigerung wurde das Tier 7690 mit 11 Bewertungspunkten dokumentiert.

Zwischen dem 24. und 28. Tag nach der Deckung des Knorpeldefektes lahmt das Minipig 7691 mit der rechten Gliedmaße deutlich, begleitet von einer reduzierten Aktivität bis zum 28. postoperativen Tag. Das Allgemeinbefinden verbesserte sich ab Tag 29. Die geringgradige Lahmheit, die ab Tag 29 bis Versuchsende zu beobachten war, tendierte an den Tagen 34, 41 und 42 zu einer deutlichen Lahmheit der rechten Gliedmaße. Das Tier erreichte am Tag des Versuchsendes einen Punktwert von 1 Punkt. Das Minipig 7693 zeigte sich zwischen dem 11. Tag nach der Defektdeckung und dem Versuchende entsprechend seiner individuellen Verhaltensweise normal - ohne eine Einschränkung des Allgemeinbefindens. Das Minipig 7385 lahmt von Tag 12 bis 15 nach der Defektdeckung geringgradig. Ab dem 16. Tag bis zum Versuchsende verhielt sich es sich normal und wurde aufgrund seines individuellen Verhaltens (siehe auch 3.2.1) mit einem Punktwert von 1,5 Punkten bewertet. Ein Tier (1604) zeigte keine Veränderung des Allgemeinbefindens. Das Tier 7675 lahmt deutlich bis zum 21. postoperativen Tag. Die in den vorigen Tagen beobachtete verringerte Aktivität bzw. Bewegungsunlust konnte bis einschließlich Tag 13 nach Deckung des Knorpeldefektes dokumentiert

werden. Ab dem 22. Tag nach der zweiten Operation bis zum Versuchsende lahmt das Minipig 7675 rechts geringgradig. Das Verhalten wurde mit 1 Bewertungspunkt beurteilt. Das zehnte Tier mit einer Beobachtungszeit von 6 Wochen (7687) zeigte am 11., 12. und zwischen dem 18. und dem 26. postoperativen Tag eine geringgradige Lahmheit rechts. Ansonsten konnten keine Abweichungen vom normalen Verhalten festgestellt werden. Zum Zeitpunkt des Versuchsendes wurde das Minipig mit 0 Bewertungspunkten dokumentiert (Tabelle 13, Abbildung 21). Die Werte beziehen sich nicht mehr auf einzelne Tage, sondern entsprechen einer „Wochen-Bewertung“, da aufgrund der Datenmenge die täglichen Beurteilungen der Tiere zu einem „7-Tage-Mittelwert“ zusammengefasst wurden.

Tabelle 13: Mittelwerte der wöchentlichen Bewertungspunkte der Tiere des 6-Wochen-Versuchs zwischen dem 11. Tag nach der Defektdeckung und dem Versuchende

<b>Tier</b>	<b>7679</b>	<b>7680</b>	<b>7681</b>	<b>7690</b>	<b>7691</b>	<b>7693</b>	<b>7385</b>	<b>1604</b>	<b>7675</b>	<b>7687</b>
<b>d 11-17</b>	9,5 ± 1	E	6,6 ± 3,2	8,6 ± 2,0	0 ± 0	0 ± 0	1,5 ± 0	0 ± 0	2,4 ± 0,5	0,2 ± 0,4
<b>d 18-24</b>	E <sup>4</sup>	E	E	E	0,4 ± 0,1	0 ± 0	1,5 ± 0	0 ± 0	1,5 ± 0,5	1 ± 0
<b>d 25-31</b>	E	E	E	E	2,4 ± 0,7	0 ± 0	1,5 ± 0	0 ± 0	1 ± 0	0,2 ± 0,4
<b>d 32-38</b>	E	E	E	E	1,1 ± 0,3	0 ± 0	1,5 ± 0	0 ± 0	1 ± 0	0 ± 0
<b>d 39-44</b>	E	E	E	E	1,3 ± 0,5	0 ± 0		0 ± 0	1 ± 0	0 ± 0

<sup>4</sup>E: Euthanasie (siehe 3.2.5)

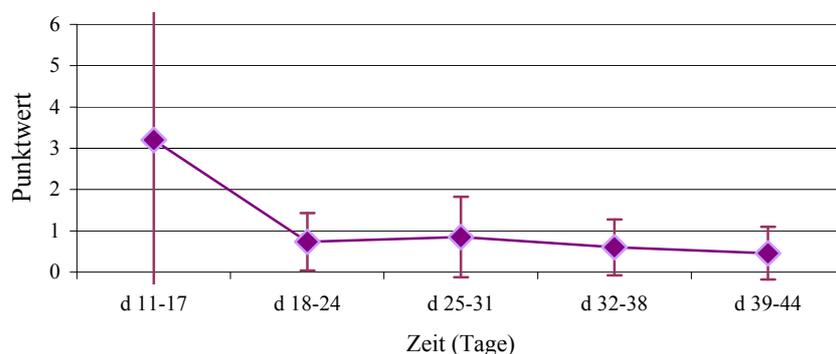


Abbildung 21: Zeitlicher Verlauf des Allgemeinbefindens der Tiere des 6-Wochen-Versuchs ab Tag 11 nach der Defektdeckung bis Versuchsende (Mittelwert mit Standardabweichung).

### Tiere des 3-Monats-Versuchs:

Das Minipig 4028 konnte zwischen dem 11. Tag nach der zweiten Operation und dem Versuchsende durchgängig mit 0 Punkten bewertet werden. Das Tier 4029 zeigte zwischen dem 11. und 30. Tag nach der Defektdeckung eine geringgradige Lahmheit rechts, ab dem 31. postoperativen Tag wurde ein normales Belasten der Gliedmaße beobachtet. Bis Versuchsende wurde das Minipig mit 0 Punkten dokumentiert. Drei Minipigs (7534, 7535, 7673) zeigten keine pathologischen Veränderungen des Allgemeinbefindens zwischen dem 11. postoperativen Tag und dem Versuchsende. Das Miniaturschwein 7677 lahmt von Tag 11 „post OP-2“ bis zur geplanten Euthanasie geringgradig mit der rechten Gliedmaße. Bewertet wurde dies bis Ende mit 1 Punkt (Tabelle 14). Aus diesen Werten resultiert die graphische Darstellung in Abbildung 22.

Tabelle 14: Mittelwerte der wöchentlichen Bewertungspunkte der Tiere des 3-Monats-Versuchs zwischen dem 11. Tag nach Defektdeckung und dem Versuchsende

Tier	4028	4029	7534	7535	7673	7677
<b>d 11-17</b>	0 ± 0	1 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 0
<b>d 18-24</b>	0 ± 0	1 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 0
<b>d 25-31</b>	0 ± 0	0,8 ± 0,3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 0
<b>d 32-38</b>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 0
<b>d 39-45</b>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 0
<b>d 46-52</b>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 0
<b>d 53-59</b>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 0
<b>d 60-66</b>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 0
<b>d 67-73</b>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 0
<b>d 74-80</b>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 0
<b>d 81-87</b>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 0

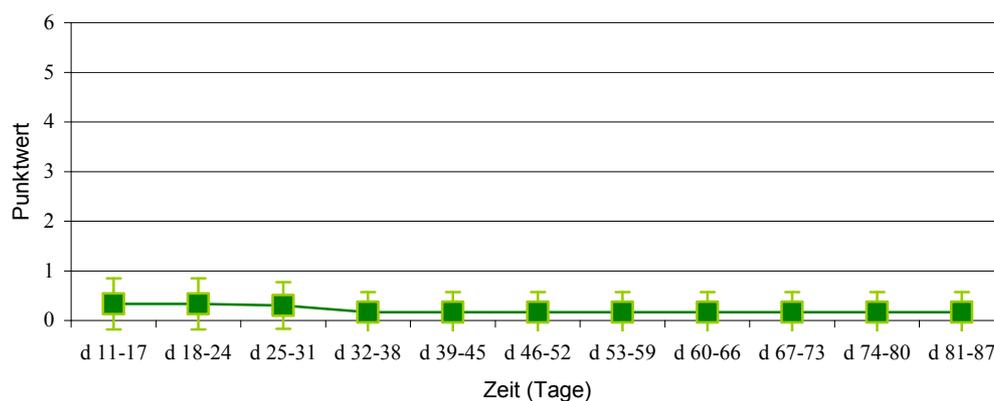


Abbildung 22: Zeitlicher Verlauf des Allgemeinbefindens aller Tiere des 3-Monats-Versuchs ab Tag 11 nach der Defektdeckung bis Versuchsende (Mittelwert mit Standardabweichung).

### Tiere des 12-Monats-Versuchs:

Die Tiere mit einer Beobachtungszeit von 12 Monaten wurden 28 beziehungsweise 29 Tage nach der Deckung des Knorpeldefektes aufgrund von Umbaumaßnahmen nach Gut Frankendorf der Universität Bonn ausgelagert. 7 Monate (circa 220. Tag) nach der Defektdeckung kamen sie für zwei Wochen in das Institut für Versuchstierkunde des Universitätsklinikums Aachen zurück, in der sie wiederum täglich beurteilt wurden. Vor Versuchsende bestand ebenfalls für zwei Wochen die Möglichkeit, das Verhalten der Tiere täglich zu beobachten und zu dokumentieren.

Das Minipig 4030 lahmt zwischen dem 11. und dem 23. Tag nach Deckung des Knorpelschadens geringgradig, ab dem 24. Tag verbesserte sich das Belasten der Gliedmaße. Das Tier wurde am 29. postoperativen Tag mit einer geringgradigen Lahmheit nach Bonn ausgelagert. In der Beobachtungsphase um den 220. Tag und vor Versuchsende konnten keine pathologischen Veränderungen des Allgemeinbefindens festgestellt werden. Zum Zeitpunkt der Euthanasie hatte das Tier eine Beurteilung von 0 Bewertungspunkten. Drei Tiere (4031, 4032, 7689) zeigten nach dem 11. Tag bis zum Versuchsende keine Veränderungen des normalen Verhaltens. Bei Minipig 7683 trat zwischen dem 14. und 25. postoperativen Tag eine geringgradige Lahmheit der rechten Gliedmaße auf. Am 28. Tag nach Defektdeckung wurde das Tier mit einer Bewertung von 0 Punkten nach Bonn ausgelagert. Zum Zeitpunkt der des Versuchsendes nach 12 Monaten wurde das Tier mit einem Punktwert von 0 Punkten bewertet. Das Tier 7684 lahmt ab dem 11. postoperativen Tag deutlich mit der rechten Gliedmaße. Diese Lahmheit verringerte sich ab dem 20. Tag zu einem geringgradigen Lahmen. Nach Bonn wurde das Tier mit einem Punktwert von 2 Punkten (1 Punkt aus präoperativer Beurteilung) entlassen. In der Beobachtungszeit um den 220. Tag und zur Zeit des Versuchsendes war keine Lahmheit mehr festzustellen. Das Tier bekam in beiden Zeiträumen durch das „präOP“ festgestellte Zurückweichen vor dem Untersucher eine Beurteilung von 1 Punkt (Tabelle 15). Die aus den Wochensummen errechneten Mittelwerte finden sich in Abbildung 23.

Tabelle 15: Mittelwerte der wöchentlichen Bewertungspunkte der Tiere des 12-Monats-Versuchs zwischen dem 11. Tag nach der Defektdeckung und dem Versuchsende

Tier	4030	4031	4032	7683	7684	7689
<b>d 11-17</b>	1 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,5 ± 0,5	3,1 ± 0,3	0 ± 0
<b>d 18-24</b>	0,9 ± 0,1	0 ± 0	0 ± 0	0,6 ± 0,2	2,2 ± 0,4	0 ± 0
<b>d 25-31</b>	0,5 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,1 ± 0,2	2 ± 0	0 ± 0
<b>d 220-235</b>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 0	0 ± 0
<b>d 350-365</b>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 0	0 ± 0

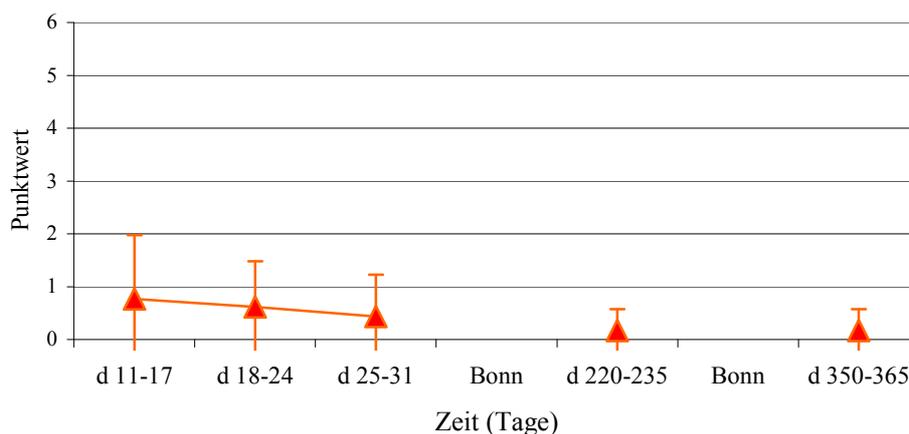


Abbildung 23: Zeitlicher Verlauf des Allgemeinbefindens aller Tiere des 12-Monats-Versuchs ab Tag 11 nach der Defektdeckung bis Versuchsende (Mittelwert mit Standardabweichung).

In Abbildung 24 ist die Häufigkeit der vergebenen Bewertungspunkte bei 18 Minipigs ohne und 4 Minipigs mit Komplikationen (siehe 3.2.4.2 und 3.2.4.3) nach der Defektdeckung als prozentualer Anteil an den insgesamt vorgenommenen Bewertungen nach der zweiten Operation dargestellt.

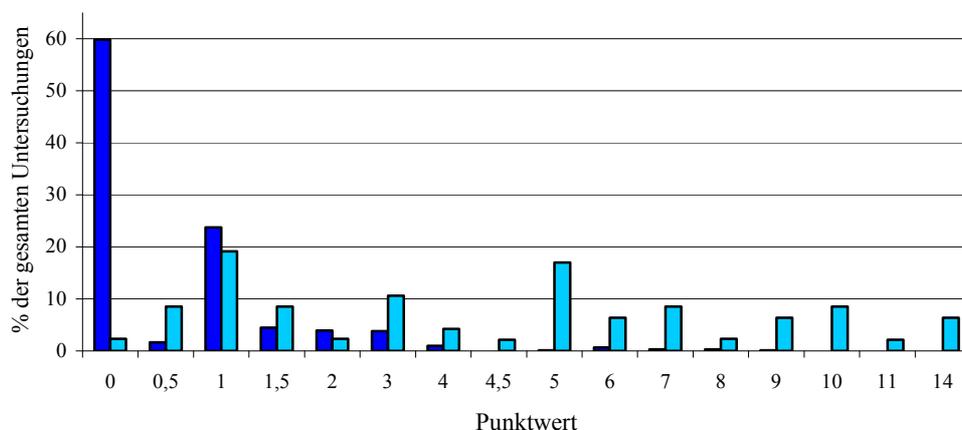


Abbildung 24: Verteilung der Bewertungspunkte nach Deckung des Knorpeldefektes als prozentualer Anteil der gesamten Untersuchungen nach der Defektdeckung bei ■ Minipigs ohne Komplikationen und ■ Minipigs mit Komplikationen (Pneumonie, Empyem).

### 3.2.4.4 Zustand der Wunde:

Bei keinem der 22 Tiere kam es im Laufe der Versuche zu gravierenden Wundheilungsstörungen. Vereinzelt kam es nach der Operation zu geringgradigen Schwellungen im Wundbereich, die sich nach einigen Tagen wieder vollständig zurückbildeten (Tabelle 16). Bei Tier 7675 lag eine Schwellung des linken Knies vor, die größtenprogreredient war. Nach vier Tagen wurde diese Schwellung in Kurznarkose und unter sterilen Bedingungen punktiert und seröse Flüssigkeit abgesaugt. Zwei Tage nach der Punktion war der Zustand der Wunde bereits wieder im Normalbereich. Bei allen Tieren wurden 14 Tage nach der Operation die Hautklammern problemlos entfernt. Dies geschah im Rahmen einer Röntgenkontrolle in Kurznarkose.

Tabelle 16: Wundverhältnis nach Induktion und Deckung des Knorpeldefektes. Weiterführung der Tabelle siehe nächste Seite.

<b>Minipig</b>	<b>Nach Defektinduktion (OP-1)</b>	<b>Nach Defektdeckung (OP-2)</b>
<b>7679</b>	o.p.B. <sup>5</sup>	o.p.B.
<b>7680</b>	o.p.B.	o.p.B.
<b>7681</b>	o.p.B.	Ab Tag 10: Verhärtung des Wundbereiches
<b>7690</b>	o.p.B.	o.p.B.
<b>7691</b>	o.p.B.	o.p.B.
<b>7693</b>	o.p.B.	o.p.B.
<b>7385</b>	o.p.B.	o.p.B.
<b>1604</b>	Tag 4 und 5: geringgradige Schwellung linker Kniebereich	o.p.B.
<b>7675</b>	Tag 4 bis 8 : Schwellung linkes Knie Tag 8: Punktion seröser Flüssigkeit Ab Tag 10: o.p.B.	o.p.B.
<b>7687</b>	o.p.B.	o.p.B.
<b>4028</b>	o.p.B.	o.p.B.
<b>4029</b>	o.p.B.	o.p.B.
<b>7534</b>	Tag 6 und 7: geringgradige Schwellung links	o.p.B.
<b>7535</b>	o.p.B.	o.p.B.
<b>7673</b>	Tag 3 und 4: geringgradige Schwellung links	Tag 4 und 5: geringgradige Schwellung rechts ab Tag 6: Rückgang der Schwellung ab Tag 9: o.p.B
<b>7677</b>	Tag 4-7: geringgradige Schwellung rechts	o.p.B.

<sup>5</sup>o. p. B: ohne pathologischen Befund

Tabelle 16- Weiterführung: Wundverhältnisse nach Induktion und Deckung des Knorpeldefektes

<b>Minipig</b>	<b>Nach Defektinduktion (OP-1)</b>	<b>Nach Defektdeckung (OP-2)</b>
<b>4030</b>	o.p.B. <sup>5</sup>	o.p.B.
<b>4031</b>	o.p.B.	o.p.B.
<b>4032</b>	Tag 3-8: circa 2 cm großes Serom rechts ab Tag 9: Rückgang des Seroms ab Tag 10: o.p.B.	o.p.B.
<b>7683</b>	Tag 5-9: circa 2 cm großes Serom beidseits ab Tag 10: Rückgang des Seroms ab Tag 12: o.p.B..	o.p.B.
<b>7684</b>	Tag 5-12: circa 3 cm großes Serom links	o.p.B.
<b>7689</b>	Tag 5-7: circa 2 cm großes Serom rechts ab Tag 8: Rückgang des Seroms ab Tag 11: o.p.B.	o.p.B.

<sup>5</sup>o.p.B: ohne pathologischen Befund

#### 3.2.4.5 Radiologische Kontrolle:

Alle Kniegelenke waren vor der Abrasion radiologisch unauffällig. Bei den Röntgenaufnahmen der Gelenke vor der Defektdeckung waren trotz Abtragung des Knorpels keine Veränderungen im Vergleich zum Ausgangsbefund festzustellen. Die Kontrollen zwei Wochen nach der Defektdeckung zeigten bis auf die transossären Bohrkanäle keine pathologischen Besonderheiten. Mit Ausnahme der drei Tiere mit Empyem, bei denen eine vermehrte Füllung der betroffenen Gelenke zu erkennen war, waren alle Befunde zum Zeitpunkt des Versuchsendes unauffällig.

#### 3.2.4.6 Serumkontrolle:

Mit Ausnahme des Miniaturschweins 7680, das aufgrund pulmonaler Dekompensation euthanasiert werden musste, zeigte keines der Tiere eine Veränderung des präoperativen gemessenen CRP-Wertes im Serum. Während das Minipig 7680 zum Zeitpunkt des Versuchsendes einen CRP-Wert von 2 mg/l aufwies, lag der Wert der übrigen 21 Tiere bei 0 mg/l. Damit lagen alle gemessenen Werte im Referenzbereich von 0-5 mg/l.

#### 3.2.5 Versuchsdauer

##### Tiere des 6-Wochen-Versuchs:

4 Tiere wurden vorzeitig aus dem Versuch genommen. Für die vorzeitig euthanasierten Tiere wurden Ersatztiere beantragt und genehmigt, um eine statistische Aussagekraft des 6-Wochen-Versuchs zu gewährleisten. Die ersten drei operierten Tiere (7679, 7681, 7690) mussten 13-15 Tage nach der Defektdeckung euthanasiert werden. Die Tiere zeigten ab dem ersten postoperativen Tag nach OP-2 deutliche Lahmheiten der rechten Gliedmaße, die sich trotz Schmerzmittelgabe nicht verbesserten. Die Lahmheiten entwickelten sich bis hin zu einem vollständigen Entlasten des Beines. Hinzu kamen reduzierte Aktivität, Bewegungsunlust und Futterverweigerung. 13-15 Tage nach der zweiten Operation wurden die Tiere in Kurznarkose einer Röntgenkontrolle unterzogen, um eventuell vorliegende Blockaden auszuschließen und den Zustand des Kniegelenks zu beurteilen. Aufgrund des klinischen Erscheinungsbildes wurde bei allen Tieren mit Auffälligkeiten eine Wundrevision in Vollnarkose unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Bei dieser zeigte sich in allen drei Fällen ein massives Kniegelenksempyem. Die Tiere wurden in Vollnarkose mittels einer Überdosis Barbiturat euthanasiert. Das linke Kniegelenk wurde ebenfalls eröffnet, und beide Gelenke zur Dokumentation der Veränderung an den Gelenkflächen und des Transplantatzustandes photographiert. Mittels einer Säge wurde die gesamte Trochlea vom Knochen abgetrennt und in ein steriles Gefäß verbracht, um sie für die weiteren Untersuchungen in das orthopädische Labor zu bringen. Ein Minipig (7680) musste aufgrund massiver Atemnot und hochgradig reduzierten Allgemeinbefindens zwei Tage nach der Defektdeckung euthanasiert werden. Auch bei diesem Tier wurden beide Kniegelenke eröffnet, photographiert und die Trochlea für weitere Untersuchungen entnommen. Beide Kniegelenke waren ohne pathologischen Befund.

## Eigene Untersuchungen

---

### Tiere des 3-Monats-Versuchs:

In dieser Gruppe gab es keine Ausfälle der Tiere. Hier überlebten alle Tiere das Ende der Beobachtungszeit von drei Monaten, nach der sie euthanasiert wurden. Die gewonnenen Proben konnten alle ausgewertet werden.

### Tiere des 12-Monats-Versuchs:

Die Tiere des 12-Monats-Versuchs wurden aus Platzgründen sechs Wochen nach der zweiten Operation nach Bonn ausgelagert. Dort standen sie mit zweiwöchiger Unterbrechung nach 7 Monaten bis zum Ende der Beobachtungszeit. Zur Euthanasie und Gewinnung der Proben wurden die Tiere wieder in das Institut für Versuchstierkunde der Universitätsklinik Aachen gebracht. Die gewonnenen Knochenpräparate konnten alle ausgewertet werden.

### 3.2.6 Postmortale Untersuchungen

#### 3.2.6.1 Makroskopische Befunde

Bei allen 18 Tieren konnte weder für die abradierte Kontrollseite noch für die Defekte, die mit Matrix gedeckt wurden, eine vollständige Füllung der Abrasionsfläche mit Regenerationsgewebe beobachtet werden.

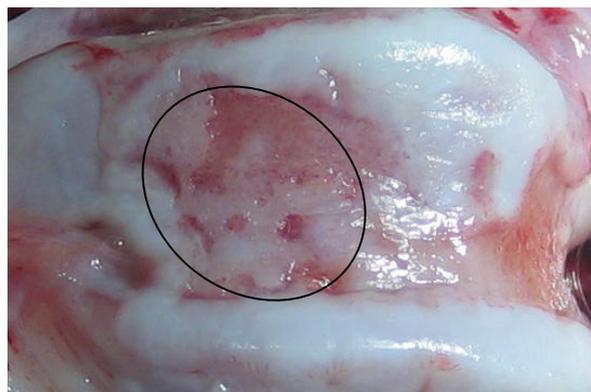
#### Unbehandelte Defekte= Kontrolle:

Bei allen 3 Gruppen wurde auf der Kontrollseite ein ausgedehnter, teilweise narbiger Defekt der Trochlea festgestellt (Abbildung 25).

A



B



C

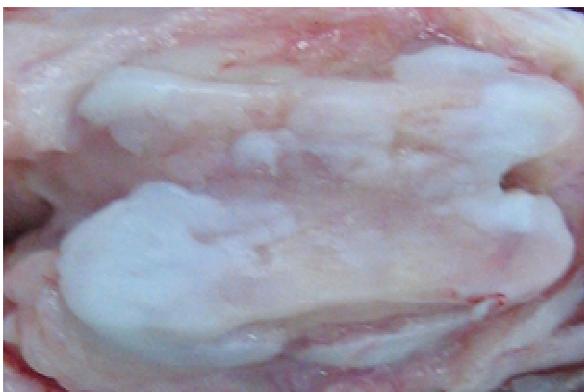


Abbildung 25: Repräsentativer makroskopischer Befund der Kontrollseite nach (A) 6 Wochen, (B) 3 Monaten und (C) 12 Monaten. Kreis: narbiges Gewebe.

## Eigene Untersuchungen

---

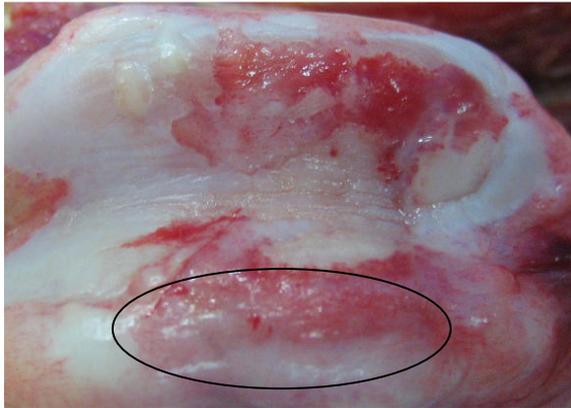
Bei 9 Tieren zeigten sich Adhäsionen der Synovialmembran mit dem Regeneratgewebe, die häufig von einer hypertrophen Synovialitis mit Gefäßeinsprossung begleitet wurde. Bei 17 Tieren konnte kein Bonding (Anbindung) an den originären Knorpel beobachtet werden, das 18. Tier zeigte ein partielles Bonding des Narbengewebes an den trochleären Knorpel. Bei keinem Explantat wurde eine glatte Oberfläche festgestellt. Bei 16 Tieren war sie zerfurcht und bei 2 Tieren rau. Das Niveau des Narbengewebes war bei 17 Tieren im Vergleich zum umgebenden Knorpel vertieft, 1 Tier wies eine erhöhte Kontur des Regenerats auf. Die Konsistenz des Narbengewebes war über den gesamten Verlauf vorwiegend weich. Nach 3 Monaten zeigte sich bei 2 Tieren und nach 12 Monaten bei einem Tier ein Regenerat, das härter als der originäre Knorpel war. Bei keinem der Tiere kam es zu einer Verbesserung der Elastizität des Narbengewebes. Der Mittelwert des Gesamt-Punktwertes lag bei den Kontrollknien zu allen Untersuchungszeitpunkten bei einem Wert von 6.

Bei der makroskopischen Beurteilung (Tabelle 17) zeigen sich deutlich höhere Werte bei der mit Zellmatrix behandelten Seite im Vergleich zu dem rein abradierten Knie bei allen drei Gruppen.

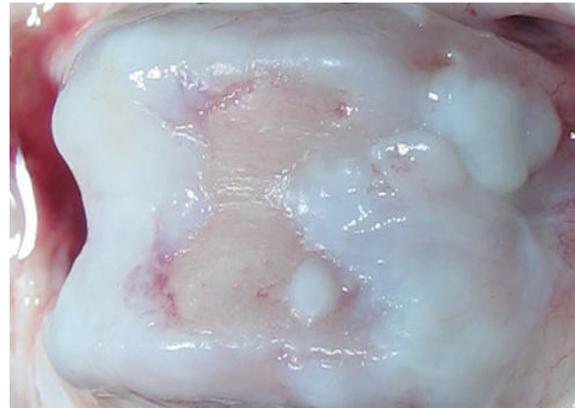
Matrixgedeckte Defekte:

Bei den mit Kollagengel gedeckten Läsionen zeigte sich bei allen 3 Gruppen ein zentraler, sulcusnaher Abrieb, der im zeitlichen Verlauf der Versuchsreihe abnahm (Abbildung 26).

A



B



C

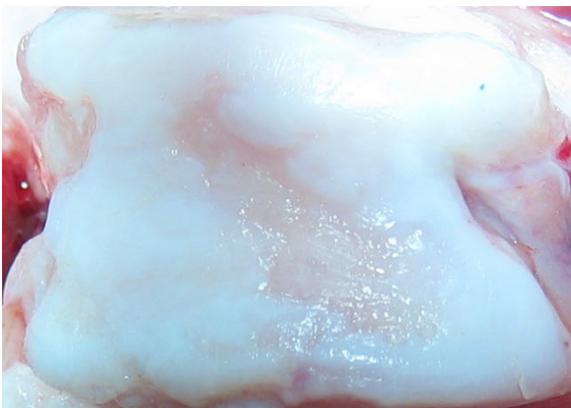


Abbildung 26: Repräsentativer makroskopischer Befund (A) 6 Wochen, (B) 3 Monate und (C) 12 Monate nach Defektdeckung. Im zeitlichen Verlauf ist deutlich eine Verringerung des sulcusnahen zentralen Abriebs der Matrix zu erkennen. Während nach 6 Wochen nur in den Randgebieten Reste der Matrix sichtbar sind (umrahmt), nimmt der von dem Kollagengel überzogene Bereich nach 3 Monaten und 12 Monaten an Größe zu.

## Eigene Untersuchungen

---

Adhäsionen der Synovialmembran zeigten sich im gesamten Beobachtungszeitraum nur bei einem Tier des 6-Wochen-Versuchs. In den Randzonen des Transplantates war im Versuchsverlauf die Bildung eines zunehmend glatten und elastischen Ersatzgewebes zu beobachten, das eine überwiegend gute Anbindung an den distal an die Trochlea angrenzenden Knorpel aufwies. Die Anhaftung an den seitlichen Knorpel wurde in den meisten Fällen festgestellt. Die Oberfläche der Randgebiete wurde überwiegend als glatt und eben beurteilt, zentral häufig als angeraut. Bei keinem Tier war die Transplantatoberfläche zerfurcht. In den Tiergruppen der 6-Wochen- und 12-Monats-Versuche lag die Höhe des Regenerates bei 2 Tieren unter, bei 6 Tieren über und bei 4 Tieren auf gleichem Niveau mit dem angrenzenden, originären Knorpel. In der Gruppe des 3-Monats-Versuchs lag das Regenerat ausschließlich unter dem Niveau des kondylären Knorpels. Bei der Palpation des Regenerats wurde eine überwiegend weichere Konsistenz im Vergleich zum umliegenden Knorpel festgestellt, die mit dem zeitlichen Verlauf an Festigkeit zunahm.

Der Mittelwert des makroskopischen Gesamt-Punktwertes der transplantierten Knie (M) lag nach 6 Wochen und 12 Monaten bei 10, nach 12 Wochen bei 7,5 Punkten (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: Makroskopische Befunde an der Trochlea und dem Transplantat im Zeitverlauf (M= Matrix, A= Abrasion ohne Deckung)

Versuchsdauer		6 Wo	3 Mo	12 Mo																																		
Tier		7691	7691	7693	7693	7385	7385	1604	1604	7675	7675	7687	7687	4028	4028	4029	4029	7534	7534	7535	7535	7673	7673	7677	7677	4030	4030	4031	4031	4032	4032	7683	7683	7684	7684	7689	7689	
Operation		M	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M	A	
Adhäsionen	(1) ja (2) nein	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1	2	2	2	1	2	1	2	1	2	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2
Randleiste	(1) kein Bonding (2) partielles Bonding (3) vollständiges Bonding	2	1	3	1	2	1	3	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	2	2	2	1	3	1	3	1
Oberfläche	(1) zerfurcht (2) rau (3) glatt	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	3	1	2	1	3	1	3	1	3	1	3	1	
Kontur	(1) vertieft (2) erhöht (3) gleiche Höhe	3	1	2	1	3	1	2	1	2	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2
Regenerat (Vergleich zum umliegenden Knorpel)	(1) weich (2) härter (3) gleich	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	2	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1
Gesamt		9	6	10	6	10	6	10	6	9	5	10	5	7	7	7	5	8	7	8	6	8	6	7	5	11	6	9	6	10	6	10	6	10	5	11	7	

### 3.2.6.2 Histologische Befunde

Für die histologische Beurteilung des Regenerats wurde sowohl für die Abrasion als auch die Defektdeckung die gleiche Lokalisation gewählt. Von den zentralen Bereichen, an denen es zu einem Abrieb gekommen war, wurden keine Schnitte angefertigt

#### Abrasion = Kontrolle:

Bei den rein abradierten Knien zeigte sich histologisch ein faseriges, zellarmes Regenerat, das vereinzelt abgeflachte Zellen enthielt, die den originären Chondrozyten in keiner Weise gleichen (Abbildung 27). Aus diesem Grund wurde das Ersatzgewebe als überwiegend fibröses Narbengewebe eingestuft.

Im Versuchsverlauf zeigten sich an der Oberfläche deutliche, teils geringe (bei 10 Tieren), aber auch schwerwiegende Fissuren und Fibrillationen (bei 8 Tieren).

Das Regenerat war bei allen Tieren unter der Oberfläche aufgefasert, kombiniert mit einer Bildung von Vakuolen. Bei 6 Tieren wurden zudem geringe und bei 12 Tieren schwere Fissuren nachgewiesen.

In keinem Fall war ein vollständiges Bonding zu verzeichnen: Bei 10 Tieren herrschte eine partielle Anbindung an den umgebenden Knorpel, bei 6 Tieren war keine Verbindung festzustellen. Die Höhe des Regenerates befand sich zu jedem Untersuchungszeitpunkt unter dem Niveau des originären Knorpels. Die qualitative Kollagenexpression wurde bei allen Minipigs zu jeder Zeit als gering eingestuft.

#### Matrixgedeckte Defekte:

Es zeigte sich ein überwiegend homogenes, zellreiches Regenerat (Abbildung 27). Bei keinem Tier konnte eine hyalinartige Struktur nachgewiesen werden. Die Chondrozyten zeigten zwar eine eher runde Struktur, waren aber nicht– wie für Chondrozyten im hyalinen Knorpel typisch – zonal ausgerichtet. Zudem fehlte die Bildung einer perizellulären Matrix. Daher wurde bei 17 Tieren die Gewebebeschaffenheit als wenig differenzierter Knorpel beurteilt, das 18. Tier wies ein fibröses Gewebe auf. Die Oberfläche des Regenerates wurde bei 11 Tieren als glatt und intakt eingestuft, bei 7 Tieren zeigten sich geringe Fibrillationen oder oberflächliche Fissuren. Im Verlauf des Hauptversuchs wurde eine Zunahme der Integrität unterhalb der Oberfläche deutlich. Während in der Gruppe des 6-Wochen-Versuchs 1 Tier einen intakten Verbund mit dem Untergrund aufwies, waren es nach 3 Monaten 2 Tiere und nach einem Jahr

4 Tiere. Alle anderen Tiere zeigten kleine Fissuren. Im Bereich des distalen Gelenkanteils und an der seitlichen Trochlea war ein teilweises bis vollständiges Bonding zum originären Knorpel nachzuweisen. Nach 6 und 12 Wochen war die Höhe des Regenerats bei insgesamt 9 Tieren mit der des angrenzenden Knorpels gleichzusetzen, bei 2 Tieren zeigte sich ein vertieftes Transplantat, bei einem Tier war das Niveau erhöht. In der Gruppe der Tiere des 12-Monats-Versuchs wurde 2x ein tiefer liegendes und 1x ein erhöhtes Transplantat festgestellt. Die Kollagenexpression war im zeitlichen Verlauf rückläufig. Während bei drei von sechs Tieren mit einer Beobachtungszeit von 6 Wochen eine hohe Expression festzustellen war, zeigte sich nach 12 Monaten bei einem von sechs Tieren ein niedriger und bei fünf von sechs Tieren ein mittelgradiger Kollagenanteil. Die histologische Beurteilung anhand des modifizierten Bewertungssystems nach O'Driscoll (1986) und die dabei vergebenen Punkte sind in Tabelle 18 aufgelistet. Die in der histologischen Beurteilung vergebenen Einzelpunkte und der mittlere Punktwert der Kontrollgruppe (A) liegen hierbei deutlich unter denen der Matrixgruppe (M).

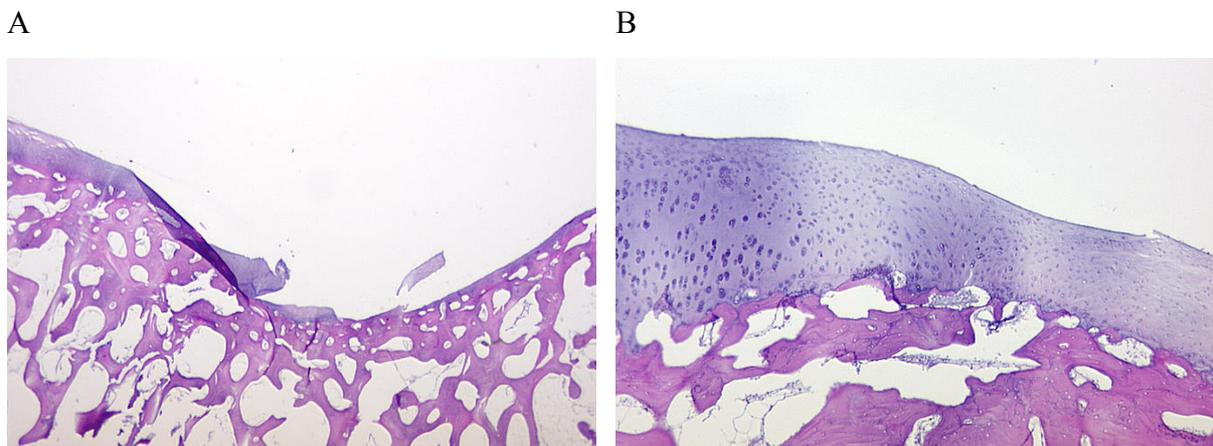


Abbildung 27: (A) Kontrollseite und (B) matrixgedeckter Defekt nach 12 Monaten



## 3.2.7 Statistik

Die statistische Auswertung des Vorversuchs ergab, dass sich die Veränderungen nach Injektion von 2x 100 U, 500 U und 1000 U Chymopapain nicht signifikant ( $p > 0,05$ ) voneinander unterscheiden. Mittels ANOVA wurde bei der Beurteilung der makroskopisch sichtbaren Veränderungen ein p-Wert von 0,93, bei der Beurteilung der histologischen Schnitte ein p-Wert von 0,73 ermittelt (Abbildung 28).

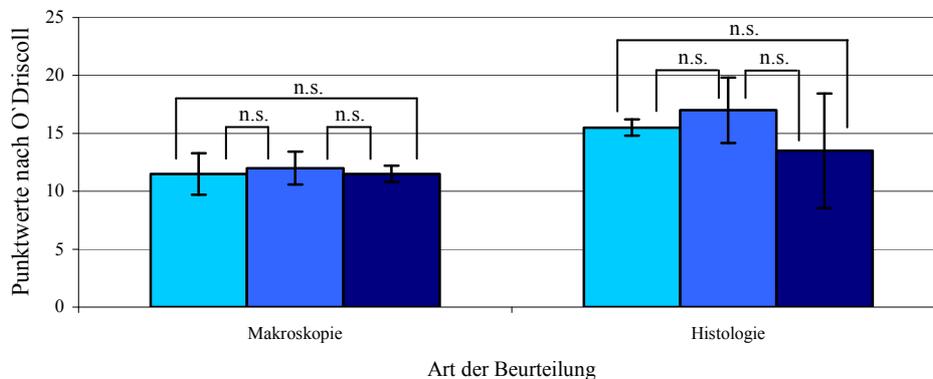


Abbildung 28: Vergleich der makroskopisch und histologisch feststellbaren Veränderungen (Mittelwert und Standardabweichung) nach Injektion von 100 U, 500 U und 1000 U Chymopapain; n. s.= nicht signifikant.

Die im Hauptversuch anhand des modifizierten Bewertungssystems nach O'Driscoll ermittelten Werte der makroskopischen Beurteilung nach Versuchsende ergaben bei der statistischen Auswertung bei allen Gruppen zwischen der Kontrollseite und der matrixtransplantierten Seite signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ). Bei dem statistischen Vergleich zwischen den Gruppen der Tieren der 6-Wochen- und der 3-Monats-Versuche zeigte die Beurteilung der Matrix signifikante Unterschiede, ebenso im Vergleich zwischen 3 Monaten und 12 Monaten, nicht aber zwischen den Tieren der 6-Wochen- und der 12-Monats-Versuche (Abbildung 29).

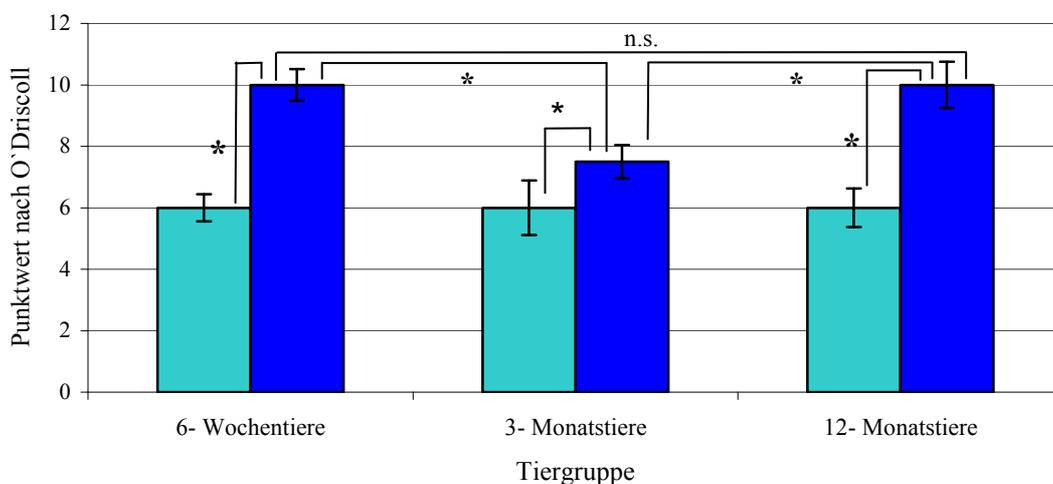


Abbildung 29: Vergleich (Mittelwert und Standardabweichung) der makroskopischen Veränderungen an der Trochlea der ■Kontrollseite und der ■matrixtransplantierten Seite bei den Tieren des 6-Wochen-, 3-Monats- und 12-Monats-Versuchs; \* =  $p < 0,05$ ; n. s.= nicht signifikant.

Die histologischen Bewertungen wurden analog zu den makroskopischen Ergebnissen statistisch ausgewertet. Auch histologisch wurde bei allen Versuchsgruppen zwischen den rein abradierten und den matrixtransplantierten Knien ein signifikanter Unterschied festgestellt. Der Vergleich der matrixtransplantierten Seite der 6-Wochen- mit der 3-Monatsgruppe wies signifikante Unterschiede auf. Sowohl zwischen den Tieren der 6-Wochen- und 12-Monatsversuche als auch zwischen den Minipigs der 3-Monats- und 12-Monats-Versuche zeigten sich bei den matrixtransplantierten Knien keine signifikanten Unterschiede. Diese Entwicklung zeigte sich auch bei der statistischen Auswertung der histologischen Befunde der Kontrollseiten (Abbildung 30).

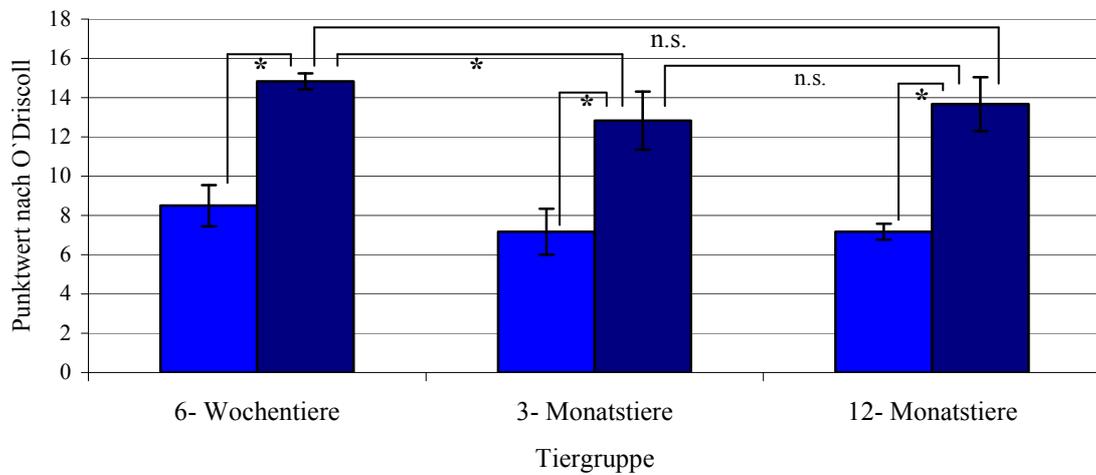


Abbildung 30: Vergleich (Mittelwert und Standardabweichung) der histologischen Veränderungen an der Trochlea der ■Kontrollseite und der ■matrixtransplantierte Seite bei den Tieren des 6-Wochen-, 3-Monats- und 12-Monats-Versuchs; \* =  $p < 0,05$ ; n. s. = nicht signifikant.

### 3.2.8 Zusammenfassung der Versuchsergebnisse

Im Rahmen des Vorversuchs konnte bei keinem von sechs Tieren nach Injektion von Chymopapain Veränderungen im Sinne einer Arthrose des Kniegelenks induziert werden. Makroskopisch zeigten sich im Versuch mit 2x 100 U Chymopapain geringe Rauigkeiten der Knorpeloberfläche. Im Versuch mit 500 U und 1000 U Chymopapain wurden einzelne tiefergehende Defekte festgestellt, die lokal begrenzt waren. In der histologischen Untersuchung zeigten sich eine Abnahme des Kollagens, geringgradige Fissuren an der Knorpeloberfläche und bei einem Tier Fissuren unter der Knorpeloberfläche. Bei zwei Tieren zeigten sich keine Unterschiede zu den jeweiligen Kontrollknien.

Bei allen 22 Tieren (18 Tiere+4 Ersatztiere) des Hauptversuchs wurde in der 1. Operation mechanisch eine großflächige Arthrose beider Kniegelenke induziert. In den folgenden 14 Tagen zeigten die meisten Tiere keine oder eine geringgradige Lahmheit ein- oder beidseits. Vereinzelt wurde eine reduzierte Aktivität beobachtet. Die Summe der ermittelten Punktzahlen zur Beschreibung des Allgemeinbefindens und der Schmerzen der Tiere (0=gut bis 15=schlecht) nach Defektinduktion ergab einen Wert zwischen 0 und 3 Punkten für alle Tiere.

In der 2. Operation wurde allen Tieren eine autologe Zellmatrix zur Deckung der induzierten Läsion in das rechte Kniegelenk transplantiert. Von den Tieren des 6-Wochen-Versuchs wurden 4 Tiere vorzeitig euthanasiert, da 3 Tiere nach der Defektdeckung ein massives Kniegelenksempyem entwickelten und ein Tier eine massive Verschlechterung des Allgemeinbefindens und hochgradige Atemnot mit Verdacht auf eine massive Pneumonie zeigte. Die drei Tiere mit Empyem erhielten Punktzahlen von 10-11. Das Minipig mit pulmonaler Dekompensation wurde mit 15 Punkten bewertet. Als Ersatz wurden im 6-Wochen-Versuch vier weitere Tiere eingesetzt.

In den ersten 10 Tagen nach der Deckung der Knorpelläsion im rechten Kniegelenk zeigten 9 der 18 Tiere mit vollständiger Versuchsdauer eine geringgradige Lahmheit, vier Tiere zeigten keine Veränderung des Allgemeinbefindens und vier Tiere lahmteten deutlich für einige Tage, davon zwei Tiere mit zeitweise reduzierter Aktivität. Ein Tier entlastete die rechte Hintergliedmaße zeitweise. Zwischen dem 11. postoperativen Tag und dem Versuchsende nach 6 Wochen, 3 Monaten und 12 Monaten zeigten 12 von 18 Tieren keine Veränderung des Allgemeinbefindens und belasteten die Hintergliedmaßen gut. Vereinzelt traten geringgradige Lahmheiten auf, die einige Tage anhielten. Bei 3 Tieren fiel nach dem 11. postoperativen Tag eine deutliche Lahmheit auf, die im zeitlichen Verlauf abnahm und sich gegen Versuchsende

nur noch bei zwei Tieren als geringgradige Lahmheit zeigte. Die Tiere zeigten eine reguläre Wundheilung. Drei Tiere mit einer Beobachtungszeit von 6 Wochen erreichten zum Zeitpunkt des Versuchsendes eine Punktzahl von 0, drei weitere Tiere lagen zwischen 1 und 1,5 Punkten. Alle Tiere des 3-Monats-Versuchs beendeten den Versuch mit einer Punktzahl von 0. Im 12-Monats-Versuch bekamen fünf von sechs Tieren vor der Euthanasie eine Bewertung von 0 Punkten, ein Tier wurde mit 1 Punkt bewertet.

Bei der makroskopischen Beurteilung der Explantate wurde weder für die transplantierte Seite noch für die abradierte Kontrollseite eine vollständige Füllung der abradierten Gelenkfläche durch Regeneratgewebe beobachtet. Alle mit einem Kollagengel gedeckten Defekte zeigten einen zentralen Abrieb des Transplantates. In den Gruppen mit längerer Versuchszeit war eine Verkleinerung der Abriebfläche sichtbar. Das gebildete Ersatzgewebe wurde als elastisches Ersatzgewebe mit größtenteils guter Anbindung an den umgebenden Knorpel und vorwiegend glatter Oberfläche eingestuft. Die Kontur des Regenerates war in den Gruppen nicht einheitlich. Bei den Tieren mit einer Beobachtungszeit von 3 Monaten lag das Ersatzgewebe unter dem Niveau des umgebenden Knorpels, in den anderen beiden Gruppen sowohl über dem Niveau als auch auf gleicher Höhe. Die Kontrollseiten wiesen einen großflächigen narbigen Defekt auf, der mit Adhäsionen der Synovialmembran mit dem Regenerationsgewebe einherging. Bei keiner Gruppe zeigte sich eine ebene Oberfläche. Ebenso wurde in allen 3 Gruppen keine Anbindung an das umliegende Gewebe festgestellt. Bei den 17 von 18 Explantaten war das Niveau vertieft. Bei den Gesamtpunkten zeigten die transplantierten Gelenke aller drei Gruppen deutlich höhere (= nach O`Driscoll bessere) Werte.

Histologisch zeigte sich bei den Defekten, die mit komprimierter Zellmatrix behandelt worden waren, ein überwiegend homogenes Regenerat, das aufgrund fehlender zonaler Ausrichtung der Chondrozyten als wenig differenzierter Knorpel eingestuft wurde. Bei den Kontrollseiten zeigte sich ein zellarmes faseriges Ersatzgewebe, dessen Oberfläche deutliche Fissuren und Fibrillationen hatte. Ein vollständiges Bonding an den angrenzenden Knorpel konnte nicht beobachtet werden. Die O`Driscoll Einzelpunktwerte der Abrasion ohne Deckung lagen deutlich unter denen der Kollagentransplantation (weniger Punkte = nach O`Driscoll schlechter).

## **4 Diskussion**

### **4.1 Konzept des Versuchs**

Bis heute stellt die Behandlung von ausgedehnten Knorpelschäden und der Gonarthrose eine orthopädische Herausforderung dar, da bisherige Therapieansätze ihre Grenzen durch die vorherrschende Defektgröße erfahren (Andereya et al. 2004). Ein von Schneider und Andereya (2003) entwickeltes neuartiges Kollagengel zeigte in einer Vergleichsstudie Vorteile gegenüber der klassischen ACT. Bisher wurde die trägergekoppelte ACT aber nur an nicht arthrotisch veränderten Gelenken und fokal begrenzten Läsionen getestet. Das Ziel der vorliegenden Studie war deshalb die Entwicklung eines Großtiermodells für den Einsatz in der orthopädischen Forschung, das einen ausgedehnten und flächenhaften Knorpelschaden ähnlich dem Erscheinungsbild der Kniegelenksarthrose aufweist.

Das Versuchskonzept sollte standardisierbar und reproduzierbar sein, und zudem sollten die Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sein. Des Weiteren sollten die Schmerzen und Schäden, die für die Tiere durch die Induktion des Defektes und den darauf folgenden Therapieversuch in Form einer Defektdeckung entstehen, im Sinne des Tierschutzes so gering wie möglich gehalten werden.

Für den Versuch wurden 28 männliche Minipigs eingesetzt. 6 Tiere bekamen im Rahmen des Vorversuchs Chymopapain in die Kniegelenke injiziert, mit dem Ziel, eine Arthrose chemisch zu induzieren. Im Hauptversuch wurde 22 (3x 6+4) Tieren in einer ersten Operation der Knorpel der gesamten Trochlea (ca. 3,5 cm<sup>2</sup>) beider Kniegelenke abradiert. Nach 14 Tagen erfolgte die Deckung des Knorpeldefektes im rechten Kniegelenk mittels eines autologen Transplantates, das aus den zuvor entnommenen Chondrozyten kultiviert worden war. In der vorliegenden Studie kamen neuartige Zellmatrixkonstrukte mit hoher Festigkeit und Primärstabilität bei großflächig arthrotisch veränderten Kniegelenken zum Einsatz. Bis Versuchsende erfolgte eine engmaschige Kontrolle des Allgemeinbefindens der Tiere. Nach einer Beobachtungszeit von 6 Wochen, 3 Monaten und 12 Monaten wurden die Tiere euthanasiert. Anschließend wurden der Knorpel beziehungsweise das Regenerat der Kniegelenke makroskopisch und histologisch untersucht.

---

## 4.2 Tiermodell

Da das Regenerationsvermögen des Knorpelgewebes bei verschiedenen Spezies mit dem Alter variiert (Reinholz et al. 2004) und Tiere im Wachstum ein höheres Regenerationspotential als ausgewachsene Tiere haben, ist es für die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den erwachsenen Menschen essentiell, adulte ausgewachsene Tiere einzusetzen. Neben dem Alter des Tieres spielen zudem auch die Größe und das Gewicht eine entscheidende Rolle, um für die Anatomie des Menschen analoge Gegebenheiten zu erreichen.

Eine weitere Rolle bei der Wahl des geeigneten Versuchstiers spielt die Knorpeldicke der einzelnen Versuchspezies, die zum Teil signifikante Unterschiede zum Menschen aufweisen (Breinan et al. 2001). Da die Struktur des tierischen Knorpels nicht an die Struktur des menschlichen Knorpels angepasst werden kann, ist es wichtig, die Geometrie des Defektes vergleichbar zu machen (Hunziker 1999). Um dies zu gewährleisten, wird ein Versuchstier mit einer dem Menschen ähnlichen Knorpeldicke benötigt. Die Knorpeldicke des Menschen im Kniegelenk wird mit Werten zwischen 1,7-2,7 mm (Chang et al. 2006), 2,2-2,4 mm (Reinholz et al. 2004) und 2-3 mm (Hunziker 1999, Stockwell 1971) angegeben.

In der orthopädischen Forschung hat sich das Minipig international als Großtiermodell für Knorpeldefekte durchgesetzt. Der Knorpel des Schweins hat gegenüber anderen Säugerspezies die größte mikroanatomische Ähnlichkeit mit dem menschlichen Knorpel. Kääb et al. (1998) fanden dies im Rahmen einer Studie zur Anordnung von kollagenen Fasern im Tibiaplateau (Gelenkfläche des Tibiakopfes) des Menschen und verschiedenen Säugern (Schwein, Hund, Schaf, Rind, Kaninchen und Ratte) heraus. Da das Hausschwein in einem dem Menschen vergleichbaren Gewicht noch nicht adult und ausgewachsen ist, bedient sich die Forschung des Miniaturschweins. Ein weiteres Kriterium, das für das Minipig als Tiermodell spricht, ist die Knorpeldicke im Kniegelenk von 1-2 mm (Chang et al. 2006), die die Dicke des menschlichen Gelenkknorpels abbilden kann.

### **4.3 Durchführung des Versuchs**

Die für die Eingewöhnung der Minipigs eingeplante Zeit von mindestens einer Woche reichte bei fast allen Tieren aus, sich an die betreuenden Personen zu gewöhnen. Lediglich ein Tier (7684) legte während der Anfangszeit der Versuchsreihe das Ausweichen vor dem Personal und dem Untersucher nicht ab. Die Gruppenhaltung der meisten Tiere konnte problemlos durchgeführt werden, da die Tiere schon im Versuchsgut Relliehausen in den entsprechenden Gruppen gehalten worden waren.

#### 4.3.1 Anästhesie

Die Prämedikation erfolgte nach einem Standardprotokoll mit Atropin, Stresnil und Ketamin intramuskulär, die Narkoseeinleitung i.v. mit Narcoren. Die Narkoseführung mittels Isofluran erwies sich durch die Kombination mit dem Analgetikum Fentanyl als verlässliche Narkose (Swindle 2007). Somit wurde eine stabile Anästhesie des Minipigs für die Operation und Manipulation am geöffneten Kniegelenk durchgeführt.

#### 4.3.2 Vorversuch

In Anlehnung an Studien mit kleineren Versuchstieren sollte zu Beginn des Versuchsprojektes die Arthrose im Kniegelenk mittels einer Injektion von Chymopapain induziert werden. Ziel war die Etablierung eines chemisch induzierbaren Arthrosemodells beim Göttinger Minipig.

Es existieren verschiedene Studien mit Meerschweinchen und Kaninchen (Kiester et al. 1994, Uebelhardt et al. 1993, Williams et al. 1993), in denen mittels intraartikulärer Injektion eine Arthrose induziert wurde. Uebelhardt et al. (1993) beschreiben, dass bereits eine geringe Menge Chymopapain einen Verlust der Proteoglykane im Gelenkknorpel verursacht. Das führt bei einer geringen Menge (0,2 mg) beim Kaninchen dazu, dass die Chondrozyten noch in der Lage sind, den Defekt zu decken. Bei höheren Mengen von 2,0 mg wird der Knorpel irreversibel geschädigt. Die Schädigung des Knorpels kommt dadurch zustande, dass das Chymopapain als proteolytisches Enzym die Proteoglykane des Knorpelgewebes angreift. Die Schädigung führt zunächst zu Fibrillationen an der Oberfläche des Knorpels und zum Verlust der Chondrozyten, später zum Verlust des gesamten Knorpels (Williams et al. 1988). In histologischen Färbungen zeigen sich neben der reduzierten Anfärbbarkeit und Schwellung der

---

Chondrozyten, Abnahme des intrazellulären Materials bis hin zu leeren Chondrozyten sowie eine Ablösung des Knorpels vom subchondralen Knochen (Bentley 1971, Farkas et al. 1974, Murray 1964).

Die Injektion des Chymopapains wurde in Bezug auf die Handhabung ohne Probleme durchgeführt, zeigte aber bei der makroskopischen Beurteilung der Veränderungen nicht den gewünschten Effekt einer großflächigen Arthrose. Obwohl in Versuchsgruppe 1 die Gabe von 100 U Chymopapain wiederholt wurde und bei Gruppe 2 und 3 die Dosis fünffach beziehungsweise zehnfach erhöht wurde, wurden nur fokale Rauigkeiten beobachtet. In diesen beiden Gruppen wurde bei 2 von 4 Tieren je 1 fokaler, tiefer gehender Defekt gefunden. Diese Läsion ist vermutlich weniger durch das oberflächlich am Knorpel wirkende Chymopapain entstanden, sondern durch Chymopapain, das bei Platzieren der Injektionsnadel versehentlich in den Knorpel abgegeben wurde.

Auch histologisch zeigten sich bei allen drei Gruppen keine Veränderungen im Sinne einer Kniegelenksarthrose. Die Induktion einer der großflächigen Arthrose ähnlichen Veränderung mittels Chymopapain konnte somit nicht etabliert werden.

#### 4.3.3 Hauptversuch

Es existieren zahlreiche Studien, bei denen an der Trochlea oder den Femurkondylen des Minipigs fokale Defekte geschaffen und frisch gedeckt wurden (Bail et al. 2003, Chang et al. 2006, Gotterbarm et al. 2003, Hembry et al. 2001, Hunziker 1999, Hunziker 2001, Hunziker und Rosenberg 1996, Mainil-Varlet et al. 2001). Die Defekte der genannten Versuchsreihen hatten eine Größe bis zu 0,5 mm x 15 mm bzw. 4 mm im Durchmesser. In diesen Studien wurden die Minipigs analog zu unserer Aufstallung nach der Operation ohne Immobilisation der operierten Gliedmaße gehalten. Im postoperativen Verlauf zeigten sich in allen Studien neben den zu erwartenden Lahmheiten in den ersten Tagen keine Komplikationen. Bail et al (2003) geben einen Zeitraum bis zur vollständigen Wiederbelastung von 2 Wochen an. Untersuchungen mit Kaninchen berichten von einer Schonung der Gliedmaße innerhalb der ersten postoperativen Woche (Salter et al. 1980). Zusammenfassend wird die fokale Defektsetzung von den Minipigs gut toleriert und verkraftet.

In der vorliegenden Studie lag ein besonderes Augenmerk darauf, ob die Tiere auch mit einem großflächigen Defekt, der die gesamte Trochlea betraf, zurechtkamen.

Da die Arthrose mit Chymopapain nicht induziert werden konnte, wurde die arthrotische Veränderung durch die mechanische Entfernung (Abrasion) des Knorpels induziert. Alle Tiere tolerierten die beidseitige Abrasion der gesamten Trochlea gut und belasteten nach Ende der Narkose alle 4 Beine. Otto (2001) gibt als zu erwartende Schmerzdauer nach Gliedmaßeingriffen und großen Gelenkeingriffen eine Spanne von 2-6 Tagen an. Nach diesem Zeitraum von 6 Tagen konnte bei 21 von 22 Tieren keine Lahmheit oder andere Veränderungen des Allgemeinbefindens, die auf Schmerzen schließen ließen, mehr beobachtet werden. Keines der Tiere hatte nach der Abrasion einen höheren Punktwert als 3 (von 15) Punkten.

Die Transplantation der autologen Zellmatrizes in das rechte Kniegelenk konnte bei allen Tieren ebenfalls wie geplant durchgeführt werden. Nach der Defektdeckung belasteten 21 der 22 Tiere alle Gliedmaßen. Das 22. Tier (Tier des 6-Wochen-Versuchs) zeigte nach dem Eingriff eine massive Verschlechterung des Allgemeinbefindens und musste aufgrund einer schweren Pneumonie bereits 2 Tage nach der Defektdeckung eingeschläfert werden. Die von der Pathologie des Universitätsklinikums Aachen gesicherte Diagnose einer Bronchopneumonie, eines Lungenödems, einer chronischen Lymphadenitis und einer Sinushistozytose lässt den Schluss zu, dass das Tier bereits vor der ersten Operation latent erkrankt war, und durch die Schwächung des Organismus infolge der Operationen die Krankheit zum Ausbruch kam und nicht mehr kompensiert werden konnte. Die ersten 3 operierten Tiere (Tiere des 6-Wochen-Versuchs) mussten zwischen dem 13. und 15. Tag euthanasiert werden, da sich das Allgemeinbefinden stark verschlechterte (10 und 11 Bewertungspunkte). Der Befund war in allen drei Fällen ein Empyem des rechten Kniegelenks. Der Grund hierfür ist wohl darin zu suchen, dass der operative Zugang zunächst so gewählt worden war, dass die Schnitte durch Haut und Kapsel nah beieinander beziehungsweise fast aufeinander lagen und somit eine gute Eintrittspforte für Erreger boten, auch wenn aus anderen Studien, bei denen der gleiche Zugang angewendet wurde, keinerlei Berichte dieser Komplikation vorliegen. Trotzdem wurde die Schnittführung so geändert, dass der Hautschnitt und der Schnitt in die Gelenkkapsel nicht direkt übereinander, sondern versetzt lagen. Dies wurde im Versuchsprotokoll als Standard übernommen. Bei den folgenden 18 Minipigs, die mit dem geänderten Zugang operiert wurden, traten keine Komplikationen im Sinne eines Empyems mehr auf.

Die höchsten Bewertungssummen von 10,11 und 15 Punkten erreichten die 4 Tiere, bei denen es zu Komplikationen kam. Diese Tiere gingen in die langfristige Beurteilung nicht ein, da die Kniegelenke nicht auswertbar waren. 17 Tiere hingegen zeigten während der ersten 10 postoperativen Tage einen Punktwert zwischen 0 und 4 Punkten. Ausnahme war in diesem Zeit-

---

raum das 18. Tier mit 9 Punkten an einem Tag, das aber schon „prä OP-1“ einen Wert von 1,5 Punkten bekam und somit eine Veränderung von 7,5 Punkten aufwies.

Die Tatsachen, dass

- den Tieren der aktuellen Studie in der ersten Operation die gesamte Trochlea beider Kniegelenke abradiert worden war,
- im Rahmen der Defektdeckung zusätzlich vier transossäre Bohrung im rechten Kniegelenk vorgenommen wurden,
- trotzdem keine signifikanten Unterschiede im Verhalten zu den Tieren nach fokalem Defekt (Bail et al. 2003, Salter et al. 1980) festzustellen waren,
- die auftretenden Lahmheiten im von Otto (2001) genannten Rahmen lagen,
- es zu keinerlei gravierenden Störungen der Wundheilung kam und
- nur die Tiere mit Komplikationen (Pneumonie, Empyem) eine deutliche Einschränkung des Allgemeinbefindens aufwiesen,

lassen den Schluss zu, dass dieser großflächige Eingriff von den Tieren gut toleriert wird - auch nach Absetzen der Analgetika.

#### 4.3.4 Bewertungssystem zur Beurteilung des Allgemeinbefindens

Da es zur Beurteilung des Allgemeinbefindens von Tieren keine verbalen Möglichkeiten gibt, beruht die Erkennung und Einschätzung von Schmerzzuständen auf einer Beobachtung des Einzeltieres (Otto 2001). Nach einer Beobachtung des Tieres aus der Distanz, bei der auf Erscheinungsbild, Spontanverhalten und Atmung geachtet wird, folgt die Annäherung an das Tier. Dies dient der Provokation von Verhaltensweisen, die auf einen möglichen schmerzhaften Zustand hinweisen. Morton und Griffith (1985) veröffentlichen erstmals einen Leitfaden zur Beurteilung von Schmerzen bei Versuchstieren. Zur Quantifizierung von schmerzbedingten Veränderungen kommen in der Forschung zunehmend Bewertungssysteme zum Einsatz, wie zum Beispiel in Schmerz- oder Analgesie-Studien mit Hunden (Lemke et al. 2002, Morton et al. 2005), Katzen (Cambridge et al. 2000) und Schafen (Otto et al. 2000).

Bei der Entwicklung und Verwendung eines Bewertungssystems ist auf tierartliche Besonderheiten zu achten, da Fluchttiere wie Wiederkäuer im Gegensatz zu Hund und Katze ein eher unauffälliges Schmerzverhalten haben (Otto 2001). Zudem ist es nicht möglich, Verhaltensweisen einer Spezies wie zu Beispiel des Hundes wie „Toben“ oder „Hin- und Herrollen“ (Otto 2001) auf andere Spezies wie Wiederkäuer und Schweine zu übertragen. Aus diesem Grund wurden für die Beurteilung der Minipigs die numerischen Schmerztabellen, die Otto (2001) für Hund und Schaf vorstellt, unter Berücksichtigung von Verhaltensweisen (Absonderung von der Gruppe, Zähneknirschen oder Fluchtverhalten), die Schweine bei Schmerzen zeigen, modifiziert.

Neben tierartspezifischen Verhaltensweisen ist auch eine Anpassung des Bewertungssystems an das jeweilige Projekt und dessen Schwerpunkte notwendig. So berücksichtigte das in der aktuellen Studie verwendete System zudem den Lahmheitsgrad der Hintergliedmaße, der von normaler Belastung bis hin zur vollständigen Entlastung der Gliedmaße reichte.

Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Durchführung einer Schmerzbewertung ist die Beobachtung des Tieres vor einer Operation, um das individuelle Normalverhalten ohne Schmerzen zu kennen und Veränderungen richtig einzuschätzen. Zusätzlich kann so bei Gruppenhaltung die Rangordnung und das Verhalten der Tiere untereinander dokumentiert werden.

Das beste zu erreichende Gesamtergebnis der vorliegenden Versuchsreihe waren 0 Bewertungspunkte, das schlechteste 15 Punkte. Vier von 22 Tieren wurden mit 10 oder mehr Bewertungspunkten bewertet. Die anderen 18 Tiere blieben - bis auf ein Tier, das für einen Tag einen Wert von 7,5 hatte - deutlich unter der 10 Punktemarke: Bei den vier Tieren, deren Beurteilung einem Punktwert von 10, 11 und 15 Punkten entsprach, wurden nach der Euthanasie hochgradige pathologische Veränderungen wie Pneumonie oder Kniegelenkempyeme festgestellt. Die Tiere, die mit weniger als 10 Punkten beurteilt wurden, zeigten im gesamten Verlauf und auch bei der Sektion keine pathologischen Auffälligkeiten.

Die Ergebnisse, dass alle Minipigs ohne Komplikationen mit deutlich weniger als 10 Bewertungspunkten beurteilt wurden, die 4 Minipigs mit hochgradig pathologischen Veränderungen mit mindestens 10 Punkten (10,11,15) beurteilt wurden und eine häufige (wenn nötig mehrmals tägliche) Wiederholung möglich ist, ohne die Tiere zu beeinträchtigen, zeigen, dass das hier eingesetzte Bewertungssystem die klinische Situation realistisch abbildet. Durch die gute Korrelation der Bewertungspunkte mit der klinischen Situation ist das System jederzeit praktikabel.

---

#### 4.3.5 Sektion, Makroskopie und Histologie

Bei allen Minipigs wurde nach dem Tod eine Eröffnung der Kniegelenke vorgenommen, um die Veränderungen zunächst makroskopisch zu beurteilen und zu dokumentieren. Nach Entnahme der gesamten Trochlea wurde diese für weitere Untersuchungen in das orthopädische Labor des Universitätsklinikums Aachen gebracht.

Bei der makroskopischen Untersuchung der rein abradierten Gelenke fiel bei allen 3 Gruppen ein ausgedehnter, teilweise narbiger Defekt der Trochlea auf. Die Oberfläche war bei allen Kontrollknien rau bis zerfurcht. Diese Befunde konnten durch die Befunde der histologischen Färbungen bestätigt werden: Bei den rein abradierten Knien wurde das Ersatzgewebe als überwiegend fibröses Narbengewebe mit faseriger, zellularer Struktur eingestuft, das keine gute Verbindung zum originären Knorpel und eine qualitativ geringe Kollagenexpression aufwies. Merkmale für eine nicht existierende Selbstheilung wie die Bildung von insuffizientem Knorpel, eingeschränkte Proliferation der Chondrozyten und Fehlen von Reparationsgewebe, werden ebenfalls in verschiedenen Studien (Convery et al. 1972, Gotterbarm et al. 2003, Hunziker. 2001, Jackson et al. 2001) beschrieben.

Bei der makroskopischen Beurteilung der matrixtransplantierten Knie wurde zentral ein Abrieb des Transplantates festgestellt. In den Randzonen des Transplantates war im Versuchsverlauf die Bildung eines zunehmend glatten und elastischen Ersatzgewebes zu beobachten. Histologisch zeigte sich das Regenerat als homogenes zellreiches Gewebe, das als wenig differenzierter Knorpel eingestuft wurde.

Das zentrale Fehlen eines Regenerats und der zentrale Abrieb des Transplantates lässt sich vermutlich durch die vorherrschende Anatomie und Dynamik des porcinen Kniegelenks erklären (Reynolds 1987). Da sich das Gelenk des Schweins immer in Beugstellung befindet, wirken dauerhaft starke Scherkräfte auf das Patellagleitlager, die beim Menschen in dieser Form nicht zu finden sind. Als weiterer Grund für den Abrieb ist auch die Tatsache zu sehen, dass sich die Tiere direkt nach der Defektdeckung für den gesamten Zeitraum der Versuchsreihe ohne Einschränkung bewegen konnten. Dies lässt vermuten, dass eine Ruhigstellung der Gliedmaße für den Behandlungserfolg großflächiger Defekte Voraussetzung ist.

### 4.3.6 Fazit

Die Ergebnisse der engmaschigen Kontrolle des Allgemeinbefindens und der Schmerzintensität zeigen, dass das Göttinger Minipig, das international als geeignetes Modell für die Überprüfung neuer Behandlungen von fokalen Gelenkknorpeldefekten anerkannt ist, aus versuchstierkundlicher Sicht auch als Großtiermodell mit einem ausgedehnten Knorpelschaden etabliert werden kann.

Das dabei verwendete Bewertungssystem zur Beurteilung des Allgemeinbefindens korrelierte mit der klinischen Situation und ist somit gut für die Überwachung der Tiere nach einem schmerzhaften Eingriff zu verwenden. Bei Eingriffen, die nicht an Gliedmaßen stattfinden, kann eine Anpassung des Systems z.B. durch die Nichtbeurteilung des Lahmheitsgrades erfolgen.

In Bezug auf die Deckung der Läsionen ist zu berücksichtigen, dass trotz erster vielversprechender makroskopischer und histologischer Ergebnisse der matrix-transplantierten Seite (im Vergleich zum Leerdefekt) auch nach einem Jahr keine vollständige Deckung nachzuweisen war. Ob und inwieweit sich die komprimierte Matrix zur Behandlung von großflächigen degenerativen Gelenkknorpelschäden eignet, ist in weiteren Studien zu klären.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das Göttinger Minipig auf seine Eignung als Arthrosemodell mit großflächigem Knorpeldefekt getestet, wobei ein neuartiger Kollagen-Knorpelzellträger zur biologischen Rekonstruktion von Kniegelenksdefekten zum Einsatz kam.

Im Rahmen des Vorversuchs wurde 6 Minipigs Chymopapain in drei verschiedenen Mengen (2x 100, 500, 1000 Units) in ein oder beide Kniegelenke injiziert, um chemisch eine großflächige Arthrose zu induzieren. Nach 8 und 12 Wochen wurden die Tiere eingeschläfert, und die Kniegelenke makroskopisch und histologisch untersucht. Da keines der Tiere arthrotische Veränderungen aufwies, wurde im Hauptteil der Studie eine Arthrose in beiden Kniegelenken von 18 Minipigs durch Abrasion mechanisch induziert. In einer 2. Operation wurde den Minipigs eine komprimierte, autologe Kollagen-Zell-Matrix zur Deckung der Läsion in das rechte Kniegelenk transplantiert. Das linke Knie diente hierbei als Kontrolle ohne Therapieversuch. Während der Versuchsdauer wurden das Allgemeinbefinden und die Schmerzäußerungen der Minipigs kontrolliert. Alle Minipigs tolerierten die Abrasion des Trochleaknorpels in beiden Kniegelenken gut, 14 von 18 Tieren den darauf folgenden Therapieversuch. Die übrigen 4 Minipigs wurden vorzeitig euthanasiert und durch 4 weitere Tiere ersetzt. Nach einer Beobachtungszeit von 6 Wochen, 3 Monaten und 12 Monaten wurden jeweils sechs Tiere euthanasiert und beide Kniegelenke makroskopisch und histologisch anhand eines modifizierten Bewertungssystems nach O'Driscoll et al. (1986) beurteilt. Die makroskopische und histologische Beurteilung der arthrotischen Knie ohne Therapieversuch zeigte ausgedehnte narbige Defekte. Auf der Seite mit der Transplantation der Kollagen-Knorpelzellträger wurde ein von den Randzonen des Defektes zunehmendes, glattes, elastisches Ersatzgewebe festgestellt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass die von Kleintiermodellen bekannte, chemische Induktion einer Arthrose mittels Chymopapain beim Göttinger Minipig trotz zweimaliger Gaben oder Vervielfachung der Dosis nicht möglich ist. Die verwendete mechanische Arthroseinduktion eignet sich beim Göttinger Minipig in Anbetracht des vertretbaren Grades der Belastung für die Versuchstiere zur Erstellung eines Arthrosemodells mit großflächigem Knorpeldefekt. Die Ergebnisse, die mit Hilfe des für die Beurteilung des Allgemeinbefindens und der Schmerzintensität verwendeten modifizierten Bewertungssystem

## Zusammenfassung

---

nach Otto (2001) gewonnen wurden, zeigten eine gute Korrelation zur klinischen Situation, was die Eignung des Bewertungssystems zur Beurteilung schmerzhafter Zustände beim Mini-pig aufzeigt. Bei der Deckung der Läsionen ist zu bedenken, dass eine - in diesem Versuch nicht durchgeführte - Immobilisation Voraussetzung für einen Behandlungserfolg sein könnte.

---

## 6 Summary

### **Establishment of an arthrosis model using Göttingen minipigs and test of a new collagen cell matrix for biological reconstruction of large chondral defects**

In this study the applicability of the Göttingen Minipig as a model for arthrosis with large chondral defects was tested, using a collagen cell matrix for biological reconstruction of knee joint defects.

As a preliminary test, Chymopapain in 3 different dosages (2x 100, 500, 1000 units) was injected into 6 minipigs' knee joints in order to induce large-area arthrosis chemically in either one or both knees of each minipig. After 8 and 12 weeks the animals were euthanized and their knee joints investigated macroscopically and histologically. As no arthrosis could be detected, it was induced mechanically by abrasion in both knee joints of 18 minipigs during the main study. During a second surgery a compressed autologous collagen cell matrix for lesion covering was transplanted into the right knee joint. The left knee joint was left untreated and thus used as a reference for control purpose. During the experiment the general condition and pain expression of the minipigs was controlled. It was shown that all minipigs tolerated the abrasion of both knee joints and 14 of 18 minipigs tolerated the following treatment attempts quite well. The other 4 animals were prematurely euthanized and replaced by 4 additional minipigs. After 6 weeks, 3 months and 12 months of observation the animals were euthanized and both knee joints were judged macroscopically and histologically, applying a modified O`Driscoll scoresystem (1986). Both evaluation methods showed expanded scarred defects of the untreated arthrotic knee joints. Investigation of the knee joint with transplanted collagen cell matrix showed an increasingly smooth and elastic replacement tissue at the border zones of abrasion.

Summarizing, it can be stated that chemical induction of arthrosis by application of Chymopapain, as it is established with small animals, was not possible in this experimental series, in spite of repeated application and increased initial dose rate. Mechanical induction, though, of arthrosis with Göttingen Minipig, is suitable for an arthrosis model with large-area chondral defects, because the grade of burden for the laboratory animal is defensible. As the evaluation of general condition and pain intensity according to the score system established by Otto

## Summary

---

(2001) correlated well to the clinical situation, it can be applied for future judging of painful state of Göttingen Minipigs. While looking at the lesions' coverage, it has to be remarked critically that immobilization of the knee junction – which was not made sure in this experimental series – could be a premise for a success of treatment.

## 7 Literaturverzeichnis

**Amiel, D; Coutts, RD; Abel, M; Stewart, S; Harwood, F; Akeson, WH (1985):**

Rib perichondral grafts for the repair of full-thickness articular-cartilage defects. A morphological and biochemical study in rabbits.

J Bone J Surg (Am) **67**: 911-920

**Amiel, D; Coutts, RD; Harwood, FL; Ishizue, KK; Kleiner, JB (1988):**

The chondrogenesis of rib perichondrial grafts for repair of full thickness articular cartilage defects in a rabbit model: a one year postoperative assessment.

Connect Tissue Res **18**: 27-39

**An, YH; Friedman, RJ (1999):**

Animal Models in Orthopaedic Research.

CRC Press, Boca Raton, London, New York; Washington D.C.

**Andereya, S; Mumme, T; Müller-Rath, R; Schneider, U (2004):**

What factors influence the results of ACT when the indication limits are exceeded?

Z Orthop **142**: 651-658.

**Andereya, S; Maus, U; Gavenis, K; Stanzel, S; Müller-Rath, R; Miltner, O; Mumme, T; Schneider, U (2007):**

Treatment of patellofemoral cartilage defects utilizing a 3D Collagen Gel: Two-Year Clinical results.

Z Orthop Unfallchir **145**: 139-145

**Bail, H; Klein, P; Kolbeck, S; Krummrey, G; Weiler, A; Schidmaier, G; Haas, NP; Raschke, MJ (2003):**

Systemic application of growth hormone enhances the early healing phase of Osteochondral defects - a preliminary study in micropigs.

Bone **32**: 457-567

**Behrens, P; Bosch, U; Bruns, J; Erggelet, C; Esenwein, SA; Gaissmaier, C; Krackhardt, T; Löhnert, J; Marlovits, S; Meenen, NM; Mollenhauer, J; Nehrer, S; Niethard, FU; Nöth, U; Perka, C; Richter, W; Schäfer, D; Schneider, U; Steinwachs, M; Weise, K (2004):**

Recommendations for Indication and Application of ACT of the Joined Advisory Board of the German Societies of Traumatology (DGC) and Orthopaedic Surgery (DGOOC).

Z Orthop **142**: 529-539

**Bentley, G (1971):**

Papain-induced degenerative arthritis of the hip in rabbits.

J Bone Joint Surg (Br) **53**: 324-337

**Bernard, J; Lemon, M; Patterson, HM (2004):**

Arthroscopic washout of the knee - a 5-year survival analysis.

Knee **11**: 233-235

**Borah, B; Dufresne, TE; Chmielewski, PA; Gross, GJ; Prenger, MC; Phipps, RJ (2002):**

Risedronate Preserves Trabecular Architecture and Increases Bone Strength in Vertebra of Ovariectomized Minipigs as Measured by Three-Dimensional Microcomputed Tomography.

J Bone Mineral Res **17**: 1139-1147

**Borrie, J; Mitchell, RM (1960):**

The sheep as an experimental animal in surgical science.

Br J Surg **47**: 435-445

**Breinan, HA; Minas, T; Hsu, HP; Nehrer, S; Sledge, CB; Spector, M (1997):**

Effects of cultured autologous chondrocytes on repair of chondral defects in a canine model.

J Bone Joint Surg (Am) **79**: 1439-1451

**Breinan, HA; Hsu, H-P; Spector, M (2001):**

Chondral Defects in Animal Models: Effects of selected repair procedures in canine.

Clin Orthop Rel Res **391**: S 219-230

**Brittberg, M (1996):**

Cartilage repair.

Göteborg University, Göteborg, Sweden

**Brittberg, M; Lindahl, A; Nilsson, A; Ohlsson, C; Isaksson, O; Peterson, L (1994):**

Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation.

New E J of Med **33**: 889-95

**Brittberg, M; Nilsson, A; Lindahl, A; Ohlsson, C; Peterson, L (1996):**

Rabbit articular cartilage defects in the knee with autologous cultured chondrocytes.

Clin Orthop Rel Res **326**: 270-283

**Bulstra, SK; Homminga, GN; Buurmann, WA; Terwindt-Rouwenhorst, E; van der Linden, AJ (1990):**

The potential of adult human perichondrium to form hyalin cartilage in vitro.

J Orthop Res **8**: 328-335

**Buser, D; Schenk, RK; Steinemann, S; Fiorellini, JP; Fox, CH; Stich, H (1991):**

Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs.

J Biomed Mater Res **25**: 889-902

**Cambridge, AJ; Tobias, KM; Newberry, RC; Sarkar, DK (2000):**

Subjective and objective measurements of postoperative pain in cats.

J Am Vet Med Assoc **217**: 685-690

**Chang, C-H; Kuo, T-F; Lin, C-C; Chou, C-H; Chen, K-H; Lin, F-H; Liu, H-C (2006):**

Tissue engineering - based cartilage repair with allogeneous chondrocytes and gelatin-chondroitin-hyaluronan tri-copolymer scaffold: a porcine model assessed at 18, 24 and 36 weeks.

Biomaterials **27**: 1876-1888

**Convery, FR; Akeson, WH; Keown, GH (1972):**

The repair of large osteochondral defects. An experimental study in horses.

Clin Orthop **82**: 253-262

**Eberhart, HD; Inman, VT; Bresler, B (1954):**

The principal elements of human locomotion. In Klopsteg, PE and Wilson, PD: Human Limbs and Their Substitutes. S. 437-471

Hafner Publishing Company, New York

**Ellegaard Göttingen Minipigs ApS: [www.minipigs.dk](http://www.minipigs.dk)**

**Europäischen Übereinkommens zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere. Verordnung zu der Annahmeerklärung vom 15. Juni 2006 über die Änderung von Anhang A.**

Bundesgesetzblatt 2007 Teil II Nr. 37: 1714-1898, ausgegeben zu Bonn am 26. November 2007

**Farkas, T; Bihari-Varga, M; Biro, T (1974):**

Thermoanalytical and histological study of intra-articular papain-induced degeneration and repair of rabbit cartilage.

Ann Rheum Dis **33**: 385-390

**FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations):**

[www.felasa.eu](http://www.felasa.eu)

**Fortmeyer, HP; Wirth, H (1984):**

Symposium über das Miniaturschwein. Zucht, Haltung, Ernährung, Versuchstiermodelle, 8/9. November, Detmold.

Herausgeber Altromin-Tierlabor-Service, Lage, Deutschland

**Furukawa, T; Eyre, DR; Koide, S; Glimcher, MJ (1980):**

Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in rabbit knee.

J Bone Joint Surg (Am) **62**: 79-89

**Gaissmaier, C; Fritz, J; Mollenhauer, J; Schneider, U; Marlovits, S; Anders, J; Schewe, B; Weise, K (2003):**

Verlauf klinisch symptomatischer Knorpelschäden des Kniegelenkes: Ergebnisse ohne und mit biologischer Rekonstruktion.

Dtsch Ärztebl **100**: A-2448-2453

**Glodek, P; Bruns, E; Oldigs, B; Holtz, W (1977):**

Das Göttinger Miniaturschwein - ein Laboratoriumstier mit weltweiter Bedeutung. 1. Mittlg.: Zuchtprogramm und Leistungsstand in der Basiszucht.

Züchtungskalender **49**: 21-32

**Glodek, P; Oldigs, B (1981):**

Das Göttinger Miniaturschwein - Entstehung und züchterische Fortentwicklung.

Schriftenreihe Versuchstierkunde, Heft 7; Verlag P. Parey, Berlin u. Hamburg.

**Gotterbarm, T; Reitzel, T; Schneider, U; Voß, HJ; Stofft, E; Breusch, SJ (2003):**

Einwachsverhalten von periostgedeckten Knochendübeln mit und ohne autologe Knorpelzellen. Eine tierexperimentelle Untersuchung am Minipig.

Orthopäde **32**: 65-73

**Grande, DA; Pitman, MI; Peterson, L; Menche, D; Klein, M (1989):**

The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation.

J Orthop Res 7: 208-218

**Gray, J (1944):**

Studies in the mechanics of the tetrapod skeleton.

J Exp Biol 20: 88

**Haring, F; Gruhn, R; Smidt, D; Schever, B (1963):**

Züchtung eines Miniaturschweines als Versuchs- und Laboratoriumstier.

Zbl Bakteriol, Parasitenkd Infekt-Kr u Hyg, Abt 1, 189: 521-537

**Haring, F; Gruhn, R; Smidt, D (1967):**

Das Göttinger Miniaturschwein.

World Rev Anim Prod 3: 76-87

**Harms, J; Mäusle, E; Diehl, K (1978):**

Problematik der Übertragbarkeit des Tierversuches in der Implantatentwicklung.

Orthopäde 7: 2-13

**Haxton, HA (July 1947):**

Muscles of the pelvic limb. A study of the differences between bipeds and quadrupeds.

Anat Rec 98: 337-346

**Hembry, RM; Dyce, J; Driesang, I; Hunziker, EB; Fosang, AJ; Tyler, JA; Murphy, G (2001):**

Immunolocalization of Matrix Metalloproteinases in Partial-Thickness Defects in Pig Articular Cartilage: A Preliminary Report.

J Bone Joint Surg (Am) **83**: 826-838

**Hogervorst, T; Meijer, DW; Klopper, PJ (1992):**

The effect of a TCP-collagen implant on the healing of articular cartilage defects in the rabbit knee joint.

J Appl Biomater **3**: 251-258

**Homminga, GN; Bulstra, SK; Kuijer, R; van der Linden, AJ (1991):**

Repair of sheep articular defects with a rabbit costal perichondral graft.

Acta Orthop Scand **62**: 415-418

**Hunziker, EB (1999):**

Biologic Repair of Articular Cartilage: Defect models in experimental animals and matrix requirements.

Clin Orthop Rel Res **367**: S135-146

**Hunziker, EB (2001):**

Growth-factor-induced healing of partial-thickness defects in adult articular cartilage.

Osteoarthritis and Cartilage **9**: 22-32

**Hunziker, EB; Rosenberg, LC (1996):**

Repair of Partial-Thickness Defects in Articular Cartilage: Cell Recruitment from the Synovial Membrane.

J Bone Joint Surg (Am) **78**: 721-733

**Hunziker EB, Kapfinger E; Müller, ME (1998):**

Removal of Proteoglycans from the surface of defects in articular cartilage transiently enhances coverage by repair cells.

J Bone Joint Surg (Br) **80**: 144-150

**Jackson, DW; Halbrecht, J; Proctor, C; van Sickle, D; Simon, TM (1996):**

Assessment of donor cell and matrix survival in fresh articular cartilage allografts in a goat model.

J Orthop Res **14**: 255-264

**Jackson, DW; Lalor, PA; Aberman, HM; Simon, TM (2001):**

Spontaneous Repair of Full-Thickness Defects of Articular Cartilage in a Goat Model: A Preliminary Study.

J Bone Joint Surg (Am) **83**: 53-64

**Jones, DG; Peterson, L (2006):**

Autologous Chondrocyte Transplantation.

J Bone Joint Surg (Am) **88**: 2501-2520

**Kääb, MJ; Gwynn, IA; Notzli, HP (1998):**

Collagen fibre arrangement in the tibial plateau articular cartilage of man and other mammalian species.

J Anat **193**: 23-34

**Kapandji, JA (1985):**

Funktionelle Anatomie der Gelenke. Band II. S. 64-73.

Enke-Verlag, Stuttgart

**Kiester, DP; Williams, JM; Andersson, GB; Thonar, EJ-MA; McNeill, TW (1994):**

The Dose-Related Effect of Intradiscal Chymopapain on Rabbit Intervertebral Discs.

Spine **19**: 747-751

**Klompaker, J; Jansen, HWB; Veth, RPH; Nielsen, HKL; de Groot, JH; Pennings, AJ (1992):**

Porous polymer implants for repair of full-thickness defects of articular cartilage: an experimental study in rabbit and dog.

Biomaterials **13**: 625-634

**Koolhaas, JM; Baumanns, J; Blom, HJM; van Holst, D (1995):**

Biologie, Zucht und Haltung von Versuchstieren. In: van Zutphen, LF; Baumanns, V; Beynen, AC: Grundlagen der Versuchstierkunde. S. 19-71

Gustav Fischer Verlag, Jena.

**König, HE; Liebich, H-G (2008):**

Anatomie der Haussäugetiere. 4. Auflage.

Schattauer Verlagsgesellschaft mBH, Stuttgart

**Lane, JG; Massie, JB; Ball, ST; Amiel, ME; Chen, AC; Bae, WC; Sah, RL; Amiel, D (2004):**

Follow-up of Osteochondral Plug Transfers in a Goat Model: A 6-Months-Study.

Am J Sports Med **32**: 1441-1450

**Lee, CR; Grodzinsky, AJ; Hsu, H-P; Martin, SD; Spector, M (2000):**

Effects of harvest and selected cartilage repair procedures on the physical and biochemical properties of articular cartilage in the canine knee.

J Orthop Res **18**: 790-799

**Lemke, KA; Runyon, CL; Horney, BS (2002):**

Effects of preoperative administration of ketoprofen on anaesthetic requirements and signs of postoperative pain in dogs undergoing elective ovariohysterectomy.

J Am Vet Med Assoc **221**: 1268-1275

**Leucht, W; Gregor, G; Stier, H (1982):**

Einführung in die Versuchstierkunde. Bd. 4, Das Miniaturschwein. S. 13-28

Gustav Fischer Verlag, Jena

**Litzke, LF; Wagner, E; Baumgaertner, W; Hetzel, U; Josimović-Alasević, O; Libera, J (2004):**

Repair of extensive articular cartilage defects in horses by autologous chondrocyte transplantation.

Annals of Biomedical Engineering **32**: 57-69

**Mainil-Varlet, P; Rieser, F; Grogan, S; Mueller, W; Saager, C; Jakob, RP (2001):**

Articular cartilage repair using a tissue-engineered cartilage-like implant: an animal study.

Osteoarthritis and Cartilage **9 A**: S6-S15

**Marlovits, S; Zeller, P; Singer, P; Resinger, C; Vécsei, V (2006):**

Cartilage repair: Generations of autologous chondrocyte transplantation.

European Journal of Radiology **57**: 24-31

**Marlovits, S; Vécsei, V (2000):**

Möglichkeiten zur chirurgischen Therapie von Knorpeldefekten – Teil 2: Chirurgische Behandlungsoptionen zur biologischen Knorpelreparatur.

Acta Chir Austriaca **32**: 185-194

**Morton, DB; Griffiths, PH (1985):**

Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment.

Vet Rec **116**: 431-436

**Morton, CM; Reid, J; Scott, M; Holton, LL; Nolan, AM (2005):**

Application of a scaling model to establish and validate an interval level pain scale for assessment of acute pain in dogs.

Am J Vet Res **66**: 2154-2166

**Moseley, JB; O'Malley, K; Petersen, NJ; Menke, TJ; Brody, BA; Kuykendall, DH; Hollingsworth, JC; Ashton, CM; Wray, NP (2002):**

A controlled trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis of the knee.

N Engl J Med **347**: 81-88

**Murray DG (1964):**

Experimentally induced arthritis using intra-articular papain.

Arthritis Rheum **7**: 211-219

**Nehrer, S; Breinan, HA; Ramappa, A; Hsu, HP; Shortkroff, S; Sledge, CB; Yannas, IV; Spector, M (1998):**

Chondrocyte-seeded collagen matrices implanted in a chondral defect in a canine model.

Biomaterials **19**: 2313-2328

**Nickel, R; Schummer, A; Seiferle, E (2003):**

Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Bd.1. Bewegungsapparat. 8. Auflage.

Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg

**O'Driscoll, SW; Keeley, FW; Salter, RB (1986):**

The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit.

J Bone Joint Surg (Am) **68**: 1017-1035

**Otto, K (2001):**

Schmerztherapie bei Klein-, Heim- und Versuchstieren.

Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg

**Otto, KA; Steiner, KHS; Zailskas, F; Wippermann, B (2000):**

Comparison of the postoperative analgesic effects of buprenorphine and piritramide following experimental orthopaedic surgery in sheep.

J Exp Anita Sci **41**: 133-143

**Räsänen, T; Messner, K (1996):**

Regional variations of indentation stiffness and thickness of normal rabbit knee articular cartilage.

J Biomed Mater Res **31**: 519-524

**Raschke, MJ; Bail, H; Windhagen, HJ; Kolbeck, SF; Weiler, A; Raun, K; Kappelgard, A; Skiaerbaek, C; Haas, NP (1999):**

Recombinant growth hormone accelerates bone regenerate consolidation in distraction osteogenesis.

Bone **24**: 81-88

**Reinholz, GG; Lu, L; Saris, DBF; Yaszemski, MJ; O`Driscoll, SW (2004):**

Animal models for cartilage repair.

Biomaterials **25**: 1511-1521

**Reynolds, TR (1987):**

Stride Length and Its Determinants in Humans, Early Hominids, Primates, and Mammals.

J Phys Anthropol (Am) **72**: 101-115

**Salter, RB; Simmonds, DF; Malcolm, BW; Rumble, EJ; Mac Michael, D; Clements, ND (1980):**

The biological effect of continuous passive motion on the healing of full-thickness defects in articular cartilage. An experimental investigation in the rabbit.

J Bone Joint Surg (Am) **62**: 1232-1251

**Schneider, U; Andereya, S (2003):**

Erste Ergebnisse einer prospektiven randomisierten klinischen Studie zur traditionellen autologen Chondrocytentransplantation versus CaRes-Technologie.

Z Orthop Ihre Grenzgeb **141**: 496-497

**Schnettler, R; Alt, V; Dingeldein, E; Pfefferle, H-J; Kilian, O; Meyer, C; Heiss, C; Wenisch, S (2003):**

Bone ingrowth in bFGF-coated hydroxyapatite ceramic implants.

Biomaterials **24**: 4603-4608

**Shahgaldi, BF; Amis, AA; Heatley, FW; McDowell, J; Bentley, G (1991):**

Repair of cartilage lesions using biological implants. A comparative histological and biomechanical study in goats.

J Bone Joint Surg (Br) **73**: 57-64

**Shortkroff, S; Baronet, L; Hsu, H-P; Wrenn, C; Gagnet, T; Chi, T; Breinan, H; Minas, T; Sledge, CB; Tubot, R; Spector, M (1996):**

Healing of chondral and Osteochondral defects in a canine model: the role of cultured chondrocytes in regeneration of articular cartilage.

Biomaterials **17**: 147-154

**Simon, WH (1970):**

Scale Effects in Animal Joints. 1. Articular Cartilage Thickness and Compressive Stress.

Arthritis and Rheum **13**: 244-255

**Stockwell, RA (1971):**

The interrelationship of cell density and cartilage thickness in mammalian articular cartilage.

J Anat **109**: 411-421

**Swindle, MM (2007):**

Swine in the laboratory.

Taylor & Francis, Philadelphia

**Tsutsumi, H; Katagiri, K; Morimoto, M; Nasu, T; Tanigawa, M; Mamba, K (2004):**

Diurnal variation and age-related changes of bone turnover markers in female Göttingen Minipigs.

Lab Anim **38**: 439-446

**Uebelhardt, D; Thonar, EJ-MA; Pietryla, DW; Williams, JM (1993):**

Elevation in urinary levels of pyridinium cross-links of collagen following Chymopapain-induced degradation of articular cartilage in the rabbit knee provides evidence of metabolic changes in bone.

Osteoarthritis Cartilage **1**: 185-192

**Vachon, AM; McIlwraith, CW; Powers, BE; McFadden, PR; Amiel, D (1992):**

Morphologic and biochemical study of sternal cartilage autografts for resurfacing induced osteochondral defects in horses.

Am J Vet Res **53**: 1038-1047

**Verordnung zum Schutz von Schweinen bei Stallhaltung (Schweinehaltungsverordnung)**

Zweite Verordnung zur Änderung der Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung. 1.8.2006

Bundesgesetzblatt 2006 Teil I Nr. 37, ausgegeben zu Bonn am 3. August 2006

**Wakitani, S; Kimura, T; Hirooka, A; Ochi, T; Yoneda, M; Yasui, N; Owaki, H; Ono, K (1989):**

Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel.

J Bone Joint Surg (Br) **71**: 74-80

**Waldeyer, A; Mayet, A (2003):**

Anatomie des Menschen. Band 1. Allgemeine Anatomie, Rücken, Bauch, Becken, Bein.  
17.Auflage.

de Gruyter Verlag, Berlin und New York

**Wei, X; Gao, J; Messner, K (1997):**

Maturation-dependent repair of untreated osteochondral defects in the rabbit knee joint.

J Biomed Mater Res **34**: 63-72

**Williams, JM; Downey, C; Thonar, EJ-MA (1988):**

Increase in levels of serum keratin sulphate following cartilage proteoglycan degradation in the rabbit knee joint.

Arthritis Rheum **31**: 557-560

**Williams, JM; Ongchi, DR; Thonar, EJ-MA (1993):**

Repair of articular cartilage injury following intra-articular chymopapain-induced matrix proteoglycan loss.

J Orthop Res **11**: 705-716

## 8 Verzeichnisse

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Trochlea nach medialem Zugang durch die Gelenkkapsel.....	18
Abbildung 2: Abrasion des Knorpels an der Trochlea mittels Kürette .....	18
Abbildung 3: Subchondraler Knochen der Trochlea nach vollständiger Abrasion des Knorpels .....	19
Abbildung 4: Transossäre Bohrungen mit vorgelegten Vicryl 6-0 Fäden für die Fixation der Matrix durch Einzelhefte.....	20
Abbildung 5: Aufgebracht autologe Kollagen-Zell-Matrix auf die Trochlea .....	21
Abbildung 6: Fixation der Matrix und der Schutzmembran mittels Einzelknopfnähten .....	21
Abbildung 7: Trochlea der unbehandelten Kontrollseite .....	33
Abbildung 8: Makroskopische Veränderungen an der Trochlea nach zweimaliger Gabe von 100 U Chymopapain, (Tier 7696 links).....	34
Abbildung 9: Makroskopische Veränderungen an der Trochlea nach 500 U (A) und 1000 U (B) Chymopapain. ....	34
Abbildung 10: Histologischer Schnitt der Kontrollseite ohne Chymopapaininjektion (HE- Färbung). ....	37
Abbildung 11: Histologischer Schnitt nach Injektion von 100 Chymopapain, linkes Kniegelenk des Minipigs 7688 (HE- Färbung). ....	38
Abbildung 12: Histologischer Schnitt nach Injektion von 500 U Chymopapain, rechtes Kniegelenk des Minipigs 7678 (HE-Färbung). ....	39
Abbildung 13: Histologischer Schnitt nach Injektion von 1000 U Chymopapain (HE Färbung), rechtes Kniegelenk des Minipigs 7685.....	40
Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf des Allgemeinbefindens aller Tiere des 6-Wochen-Versuchs nach Defektinduktion (OP) (Mittelwert mit Standardabweichung). ....	44
Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf des Allgemeinbefindens aller Tiere des 3-Monats-Versuchs nach Defektinduktion (OP) (Mittelwert mit Standardabweichung). ....	45

Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf des Allgemeinbefindens aller Tiere des 12-Monats-Versuchs nach Defektinduktion (OP-1) (Mittelwert mit Standardabweichung).....	47
Abbildung 17: Prozentuale Verteilung der vergebenen Punktwerte bei Bewertung des Allgemeinbefindens und der Schmerzintensität der 22 Tiere des Hauptversuchs nach Abrasion bis zur 2. Operation. ....	47
Abbildung 18: Zeitlicher Verlauf des Allgemeinbefindens aller Tiere des 6-Wochen-Versuchs, Tag 1-10 nach der Defektdeckung (OP-2) (Mittelwert mit Standardabweichung).....	50
Abbildung 19: Zeitlicher Verlauf des Allgemeinbefindens aller Tiere des 3-Monats-Versuchs, Tag 1-10 nach der Defektdeckung (OP-2) (Mittelwert mit Standardabweichung). ....	51
Abbildung 20: Zeitlicher Verlauf des Allgemeinbefindens aller Tiere des 12-Monats-Versuchs, Tag 1-10 nach der Defektdeckung (OP-2) (Mittelwert mit Standardabweichung).....	53
Abbildung 21: Zeitlicher Verlauf des Allgemeinbefindens der Tiere des 6-Wochen-Versuchs ab Tag 11 nach der Defektdeckung bis Versuchsende (Mittelwert mit Standardabweichung). 56	
Abbildung 22: Zeitlicher Verlauf des Allgemeinbefindens aller Tiere des 3-Monats-Versuchs ab Tag 11 nach der Defektdeckung bis Versuchsende (Mittelwert mit Standardabweichung). 57	
Abbildung 23: Zeitlicher Verlauf des Allgemeinbefindens aller Tiere des 12-Monats-Versuchs ab Tag 11 nach der Defektdeckung bis Versuchsende (Mittelwert mit Standardabweichung). 59	
Abbildung 24: Verteilung der Bewertungspunkte nach Deckung des Knorpeldefektes als prozentualer Anteil der gesamten Untersuchungen nach der Defektdeckung bei ■Minipigs ohne Komplikationen und ■Minipigs mit Komplikationen (Pneumonie, Empyem).....	60
Abbildung 25: Repräsentativer makroskopischer Befund der Kontrollseite nach (A) 6 Wochen, (B) 3 Monaten und (C) 12 Monaten.....	65
Abbildung 26: Repräsentativer makroskopischer Befund (A) 6 Wochen, (B) 3 Monate und (C) 12 Monate nach Defektdeckung.....	67
Abbildung 27: (A) Kontrollseite und (B) matrixgedeckter Defekt nach 12 Monaten .....	71
Abbildung 28: Vergleich der makroskopisch und histologisch feststellbaren Veränderungen (Mittelwert und Standardabweichung) nach Injektion von ■100 U, ■500 U und ■1000 U Chymopapain. ....	73

---

Abbildung 29: Vergleich (Mittelwert und Standardabweichung) der makroskopischen Veränderungen an der Trochlea der ■Kontrollseite und der ■matrixtransplantierten Seite bei den Tieren des 6-Wochen-, 3-Monats- und 12-Monats-Versuchs .....	74
Abbildung 30: Vergleich (Mittelwert und Standardabweichung) der histologischen Veränderungen an der Trochlea der ■Kontrollseite und der ■matrixtransplantierten Seite bei den Tieren des 6-Wochen-, 3-Monats- und 12-Monats-Versuchs .....	75

## 8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Angaben der Firma Ellegaard für die Haltung von Minipigs in Laufställen.....	3
Tabelle 2: Angaben der Firma Ellegaard für die Haltung von Minipigs in Käfigen .....	3
Tabelle 3: Bewertungssystem zur Beurteilung der Makroskopie und Histologie des Gelenkknorpels an der Trochlea (modifiziert nach O`Driscoll et al. 1986).....	16
Tabelle 4: Numerische Verhaltens- und Schmerzbewertungstabelle (Modifiziert nach Otto 2001).....	26
Tabelle 5: Makroskopische Veränderungen des Knorpels an der Trochlea nach Behandlung mit 2x 100 U, 500 U und 1000 U Chymopapain (modifiziert nach O`Driscoll et al. 1986)....	36
Tabelle 6: Histologische Veränderungen des Knorpels an der Trochlea nach Behandlung mit 2x 100 U, 500 U und 1000 U Chymopapain (modifiziert nach O`Driscoll et al.1986).....	41
Tabelle 7: Summe der täglichen Bewertungspunkte der Tiere des 6-Wochen-Versuchs vor Defektinduktion und an den Tagen 1-10 post OP.....	43
Tabelle 8: Summe der täglichen Bewertungspunkte der Tiere des 3-Monats-Versuchs vor Defektinduktion und an den Tagen 1-10 post OP.....	45
Tabelle 9: Summe der täglichen Bewertungspunkte der Tiere des 12-Monats-Versuchs vor Defektinduktion und an den Tagen 1-10 post OP.....	46
Tabelle 10: Summe der täglichen Bewertungspunkte der Tiere des 6-Wochen-Versuchs vor Defektdeckung und an den Tagen 1-10 danach.....	49
Tabelle 11: Summe der täglichen Bewertungspunkte der Tiere des 3-Monats-Versuchs vor Defektdeckung und an den Tagen 1-10 danach.....	51
Tabelle 12: Summe der täglichen Bewertungspunkte der Tiere des 12-Monats-Versuchs vor Defektdeckung und an den Tagen 1-10 danach.....	53
Tabelle 13: Mittelwerte der wöchentlichen Bewertungspunkte der Tiere des 6-Wochen-Versuchs zwischen dem 11. Tag nach der Defektdeckung und dem Versuchende.....	55
Tabelle 14: Mittelwerte der wöchentlichen Bewertungspunkte der Tiere des 3-Monats-Versuchs zwischen dem 11. Tag nach Defektdeckung und dem Versuchende.....	57

---

Tabelle 15: Mittelwerte der wöchentlichen Bewertungspunkte der Tiere des 12-Monats-Versuchs zwischen dem 11. Tag nach der Defektdeckung und dem Versuchsende .....	59
Tabelle 16: Wundverhältnis nach Induktion und Deckung des Knorpeldefektes. Weiterführung der Tabelle siehe nächste Seite.....	61
Tabelle 17: Makroskopische Befunde an der Trochlea und dem Transplantat im Zeitverlauf (M= Matrix, A= Abrasion ohne Deckung).....	69
Tabelle 18: Histologische Befunde an der Trochlea und dem Transplantat im Zeitverlauf (M= Matrix, A= Abrasion ohne Deckung).....	72



## 9 Danksagung

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. B. Aigner für seine Bereitschaft, meine Dissertation an der Ludwig-Maximilian-Universität einzureichen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. F.U. Niethard für die Bereitstellung des Themas bedanken.

Herrn Prof. Dr. R. Tolba danke ich vor allem für Ratschläge, Kritik und Unterstützung beim Verfassen dieser Arbeit - auch für das Festlegen der Deadline.

Herrn Dr. S. Andereya danke ich für die Betreuung in Form von interessanten Operationen, nicht weniger interessanten Diskussionen, Spaß an der Wissenschaft und für sein Vertrauen, das er mir bei der Betreuung und Beurteilung unserer Minipigs entgegen gebracht hat.

Herrn Dr. U. Maus danke ich dafür, dass er sich für mich und meine Fragen immer Zeit genommen hat, obwohl sein Tag auch nicht mehr als 24 Stunden hat.

Ebenso möchte ich mich bei meinen Kollegen des Institutes für Versuchstierkunde bedanken, die mir eine große Hilfe waren. Insbesondere bei Herrn Stopinski, von dem ich seit Beginn unserer Zusammenarbeit unendlich viel lernen durfte.

Frau Steinebach und Herrn Dr. Gavenis danke ich für die Herstellung der Kollagengele und die Anfertigung und Färbung der histologischen Schnitte.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Bastian und meiner Familie inklusive meiner besten Freundin Annette für ihre unermüdliche Unterstützung, ihre guten Nerven und der Hilfe beim Besiegen des inneren Schweinehundes.

Und nicht zu vergessen: Danke an 28 Göttinger Miniaturschweine, ohne die wir dieses Projekt nie hätten durchführen können.