

## 8 Eigene Untersuchungen

Ziel der Studie ist, den Einsatz von MPO und CRP als Marker in Diagnostik und Therapie der OA weiter voranzubringen. Es wurde die MPO-Aktivität in Synovia und Serum und die Konzentration von CRP im Serum von Hunden, die an OA erkrankt sind, bestimmt. Insbesondere wurden das klinische Erscheinungsbild und die Schmerzhaftigkeit der OA analysiert, um diese zu objektivieren.

### 8.1 Material und Methoden

In der Studie wurden 75 Hunde untersucht, die zwischen April und Oktober 2004 an der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin aufgrund einer Gelenkerkrankung arthrotomiert oder arthroskopiert wurden.

Lahmheitsdauer, Art der Lahmheit und Auslöser sowie etwaige Vorbehandlung wurden anamnestisch erfragt. 44 % der Patienten (n=33) waren mit nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAIDs) (Carprofen oder Meloxicam) vorbehandelt. Ein Hund war mit Magnetresonanztherapie behandelt.

Die Hunde wurden allgemein klinisch untersucht, um möglichst andere Erkrankungen auszuschließen. Jedem Hund wurde eine Blutprobe entnommen. In der orthopädischen Untersuchung wurden die Gliedmaßen untersucht. Für das zu operierende Gelenk wurden folgende Parameter detailliert erfasst und graduiert.

#### **Krepitation:**

- Keine Krepitation bei passiver Bewegung des Gelenks
- Gelegentlich geringgradige Krepitation in den letzten Phasen der Beugung und/oder Streckung feststellbar
- Phasenweise mittelgradige Krepitation bei Beugung und/oder Streckung
- Hochgradige Krepitation in allen Bewegungsphasen

#### **Reaktion auf Palpation:**

- Keine Reaktion
- Winseln
- Versucht auszuweichen
- Versucht zu beißen

### **Gelenkfüllung:**

- Nicht vermehrt gefüllt
- Vermehrt gefüllt
- Deutlich vermehrt gefüllt
- Hochgradig gefüllt

### **Schmerzhaftigkeit:**

- Nicht schmerzhaft
- Schmerzhaft bei maximaler Extension und/oder Flexion
- Schmerzhaft bei minimaler Bewegung
- Schmerzhaft bei jeglicher Manipulation

### **Lahmheit:**

- O Lahmheitsfrei in allen Bewegungsphasen
- I Undeutliche geringgradige Lahmheit, stetige Nutzung der Gliedmaße, aber kaum feststellbare Entlastung
- II Deutliche geringgradige Lahmheit, stetige Nutzung der Gliedmaße, aber deutlich feststellbare gelegentliche Entlastung
- III Mittelgradige Lahmheit, Gliedmaße wird phasenweise nicht genutzt, aber noch abgestellt
- IV Hochgradige Lahmheit, Gliedmaße wird nicht genutzt

Die Parameter Gelenkfüllung, Schmerzhaftigkeit und Lahmheit wurden detailliert mit einer Visuellen Analogskala von 0 bis 10 cm analysiert. Am Nullpunkt ist das Symptom nicht vorhanden, während es bei 10 sehr ausgeprägt ist.

Abbildung 3: Schema Visuelle Analogskala



## 8.2 Bildgebende Verfahren

Vom erkrankten und kontralateralen Gelenk wurden Röntgenaufnahmen in zwei zueinander senkrecht stehenden Ebenen angefertigt (Röntgengrundbildpaar).

Die Röntgenaufnahmen des Kniegelenks wurden in Anlehnung an BRUNNBERG (1987) ausgewertet. Es wurden Veränderungen in verschiedenen Lokalisationen beobachtet, graduiert und vier Osteoarthritisgraden zugeteilt.

### Grad 0 OA-frei:

Tibiakondylen:	scharf konturiert; Eminentia interkondylica deutlich erhaben, nur die kaudale Begrenzung des Sulcus extensorius ist erkennbar;
Femurkondylen:	scharf konturiert; kaudal stärker gekrümmt;
Ossa sesamoidea:	scharf konturiert;
Fossa extensoria:	als kleine Grube erkennbar;
Patella:	scharf konturiert; Basis und Apex sind leicht angeschrägt und glatt.

### Grad 1 geringgradige OA:

Tibiakondylen:	unscharf konturiert, Eminentia interkondylica abgeflacht oder die kraniale und kaudale Begrenzung des Sulcus extensorius sind erkennbar;
Femurkondylen:	unscharf konturiert;
oder	
Ossa sesamoidea:	unscharf konturiert;
Fossa extensoria:	als große Grube erkennbar;
Patella:	unscharf konturiert, Basis und Apex sind glatt ohne Auflagerungen.

### Grad 2 mittelgradige OA:

Tibiakondylen:	unscharf konturiert; Eminentia interkondylica abgeflacht, die Begrenzungen des Sulcus extensorius sind deutlich erkennbar;
Femurkondylen:	unscharf konturiert;
Ossa sesamoidea:	unscharf konturiert;
Fossa extensoria:	als große Grube erkennbar;

Patella: unscharf konturiert, Basis und Apex sind durch Auflagerungen ausgezogen.

**Grad 3 hochgradige OA:**

Tibiakondylen: unscharf konturiert; Eminentia interkondylica abgeflacht, Sulcus extensorius deutlich begrenzt; durch Auflagerungen ist der Tibiakopf kaudal ballonartig ausgezogen;

Femurkondylen: unscharf konturiert, Krümmung durch Auflagerungen stark abgeflacht;

Ossa sesamoidea: Auflagerungen;

Fossa extensoria: groß;

Patella: unscharf konturiert, Basis und Apex sind durch Auflagerungen ausgezogen.

Die Röntgenaufnahmen des Ellbogengelenks wurden entsprechend der Angaben nach BRUNNBERG und VIEHMANN (1999) und der "International Elbow Working Group" (IEWG, 1995) beurteilt und in vier Osteoarthritisgrade eingeordnet.

**Grad 0 OA frei:**

Incisura trochlearis: kaum bis geringgradige Sklerosierung

Keine weiteren Veränderungen

**Grad 1 geringgradige OA:**

Incisura trochlearis: Sklerosierung

Exostosen: <1mm an mindestens einer der folgenden Lokalisationen:  
Processus anconaeus, kranialer Rand des Caput radii und/  
oder Epikondylus medialis/lateralis humeri

**Grad 2 mittelgradige OA:**

Incisura trochlearis: deutliche Sklerosierung;

Exostosen: bis 3 mm in mindestens einer Lokalisation

**Grad 3 hochgradige OA:**

Incisura trochlearis: deutliche Sklerosierung;

Exostosen: über 3 mm in mindestens einer Lokalisation;

Die Hüftgelenke wurden in Anlehnung an BRUNNBERG (1987) bewertet.

**Grad 0 OA frei:**

Gelenkpfanne:	tief, scharf konturiert, keine Auflagerungen;
Gelenkspalt:	konzentrisch begrenzt;
Femurkopf:	kugelförmig, scharf konturiert, sitzt tief in der Pfanne;
Femurhals:	schlank, deutlich abgesetzt, scharf konturiert, dichte Knochenstruktur.

**Grad 1 geringgradige OA:**

Gelenkpfanne:	abgeflacht oder unscharf konturiert oder Auflagerungen sichtbar;
Gelenkspalt:	divergent;
Femurkopf:	entrundet, unscharf konturiert;
Femurhals:	walzenförmig oder verkürzt, oder unscharf konturiert oder in der Struktur aufgelockert.

**Grad 2 mittelgradige OA:**

Gelenkpfanne:	abgeflacht, unscharf konturiert, Auflagerungen sichtbar;
Gelenkspalt:	divergent;
Femurkopf:	pilzförmig oder eckig;
Femurhals:	walzenförmig oder verkürzt und unscharf konturiert und in der Struktur aufgelockert.

**Grad 3 hochgradige OA:**

Gelenkpfanne:	flach, unscharf konturiert, Auflagerungen;
Gelenkspalt:	divergent;
Femurkopf:	abgeflacht oder pilzförmig oder eckig und subluxiert;
Femurhals:	walzenförmig, verkürzt, unscharf konturiert und in der Struktur aufgelockert.

Die Röntgenaufnahmen der Schultergelenke wurden in Anlehnung an LJUNGGREN und OLSSON (1975) und MORGAN und POOL (1987) beurteilt.

**Grad 0: Osteoarthritis frei:**

keine Konturverluste im Bereich des Caput humeri und im Sulcus intertubercularis, keine Veränderungen feststellbar.

**Grad 1 Geringgradige OA:**

geringgradige subchondrale Sklerosierung im Bereich des kaudalen Randes des Caput humeri und der Cavitas glenoidalis, Konturverlust im Bereich des Caput humeri und im Sulcus intertubercularis.

**Grad 2 Mittelgradige OA:**

Exostosenbildung <1mm an mindestens einer der folgenden Lokalisationen: Tuberculum infraglenoidale, kaudaler Rand der Cavitas glenoidalis, Sulcus intertubercularis, Kaudalrand des Caput humeri.

**Grad 3 Hochgradige OA:**

Exostosenbildung bis zu 3 mm in mindestens einer dieser Lokalisationen.

### **8.3 Gewinnung der Synovia**

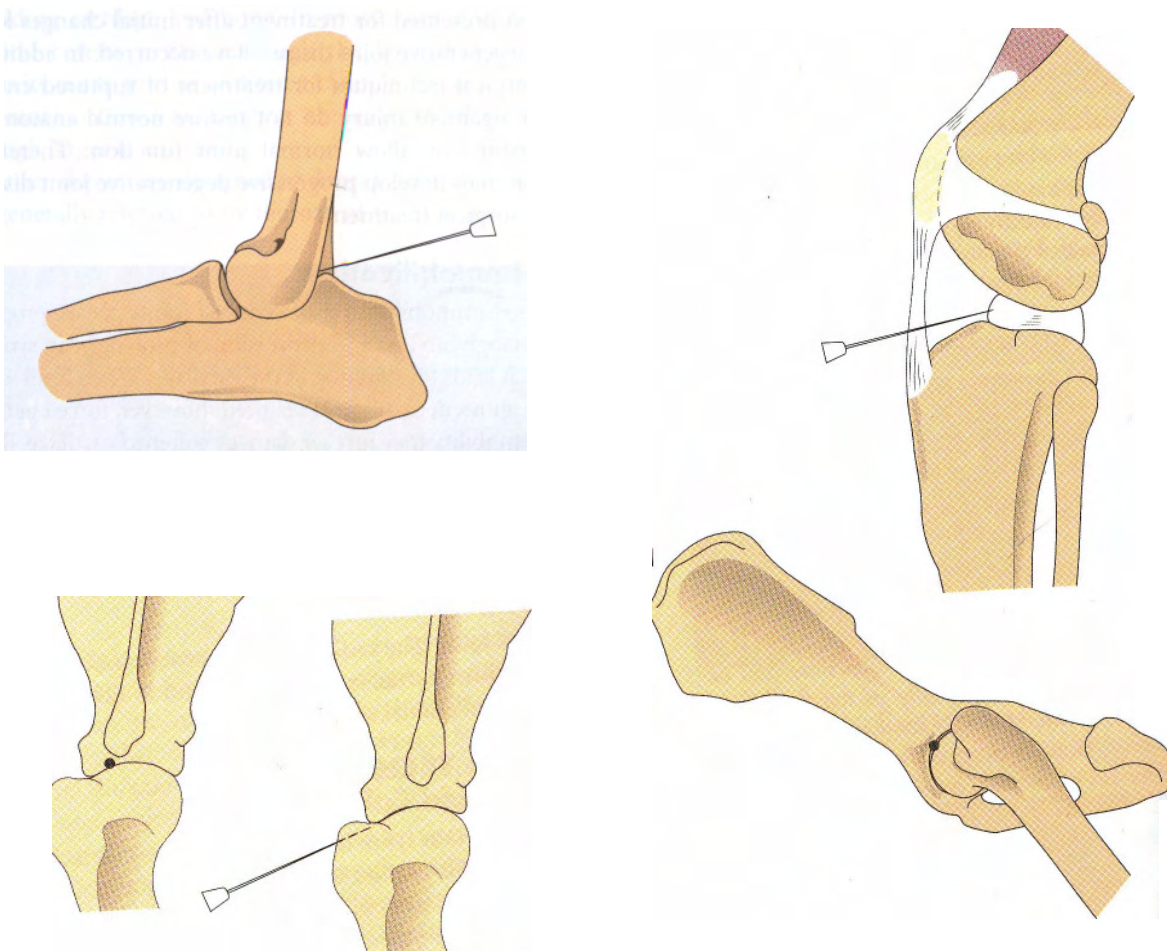
Serum wurde unter sterilen Bedingungen noch vor der Sedation gewonnen.

In Sedation wurde das nicht erkrankte kontralaterale Gelenk unter aseptischen Kautelen punktiert und Synovia entnommen. Dazu wurden die von JOHNSON und HULSE empfohlenen Punktionsstellen gewählt (siehe Abbildung 4).

Die Synovia des erkrankten Gelenks wurde intra operationem vor Inzision der Gelenkkapsel mit einer Kanüle in eine 5 ml Spritze aufgezogen.

Die Synovia wurde verworfen, falls sie sichtbare Blutbeimengungen enthielt oder falls die Menge zu gering war (<0,15 ml), um sie analysieren zu können.

Abbildung 4: Gelenkpunktion nach JOHNSON und HULSE (2002)



Quelle: JOHNSON und HULSE (2002)

#### 8.4 Aufbereitung der Synovia

Aussehen und Viskosität der Synovia wurden beurteilt. Anschließend wurde die Synovia bei 5000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde bei -20°C in sterilen Gefäßen, ggf. portioniert, tiefgefroren.

Das Serum wurde abzentrifugiert (5 Minuten bei 5000 U/min) und bei -80°C tiefgefroren.

#### 8.5 Bestimmung der Myeloperoxidase-Aktivität

Die photometrische Aktivitätsbestimmung der MPO erfolgte mit einem o-Dianisidine Assay. Der Ansatz von KUMAR et al. 2002 wurde für den Einsatz beim Hund optimiert. Die Bestimmung wurde am Institut für Veterinär-Biochemie der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Das Substrat für eine Probe setzte sich zusammen aus:

- 0,25 ml 0,1 M Natrium Citratpuffer, pH 5,5 (mit NaOH eingestellt)
- 0,34 µl Triton-X-100
- 2,5 µl 82,4 mM o-Dianisidin/DMSO

Von diesem Substratmix wurden bei der MPO-Aktivitätsbestimmung aus der Synovia 240 µl eingesetzt. 30 µl der Probe wurden 1:1 mit Citratpuffer verdünnt und 60 µl dieses Ansatzes hinzugegeben. Anschließend wurde die Reaktion mit 1,31 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ 990 µl H<sub>2</sub>O) gestartet.

Parallel wurden in einem weiteren Ansatz 5 µl eines MPO spezifischen Inhibitors (ABAH) zugegeben.

Unmittelbar nach Zugabe des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in einer Mikrotiterplatte wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm in einem Photometer (Fa. Bio-RAD Model 550 Microplate Reader) gemessen. Die Absorptionsmessung wurde in einem 5 Minutenabstand 5-mal in Folge wiederholt.

Mit Hilfe des Microplate Manager® 4.01 Bio-Rad Laboratories, Inc. wurde die Linearität überprüft. Die Aktivität wurde mit folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Volumenaktivität (mU/ml)} = \frac{\Delta E \times V}{t \times \epsilon \times d \times v}$$

$\Delta E$  Differenz aus Extinktion des Endwertes und Extinktion des Anfangswertes

$t$  Zeit (20 Minuten)

$\epsilon$  spezifischer millimolarer Extinktionskoeffizient für MPO bei 450 nm und 25°C = 11,48 x mM<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>

$V$  Volumen der Messlösung

$v$  Probenvolumen 30 µl

$d$  Schichtdicke der Küvette

Anschließend wurde die MPO-Volumenaktivität der Probe mit Inhibitor von dem Wert der Probe ohne Inhibitor abgezogen.

Als Standard wurde bei jeder Bestimmung eine Probe reine MPO (Fa. Calbiochem®) als Referenz eingesetzt. Die Intraassay-Varianz lag bei 0,00665 mU/µl.

Die Aktivität der MPO im Serum wurde mit demselben Versuchsaufbau bestimmt. Das Serum wurde allerdings vor Zugabe im Verhältnis 1:10 mit Citratpuffer verdünnt. Dies wurde auch bei der Berechnung berücksichtigt.



## 8.6 CRP-Bestimmung

Das C-reaktive Protein wurde im Serum aller Hunde bestimmt. Dazu wurde der ELISA Testkit der Fa. Tridelta verwendet. Die Proben wurden im Doppelansatz gemessen und der Mittelwert berechnet. Die Intraassay-Varianz lag bei 0,07 ng/ml.

## 8.7 Kontrolltiere

Zur Kontrolle wurden acht Hunden Serum und Synovia entnommen. Es wurden die Kniegelenke punktiert. Diese Tiere ließen weder annamnetisch noch aufgrund der bildgebenden Diagnostik eine OA vermuten. Die Tiere wurden aus anderen Krankheitsgründen operiert bzw. euthanasiert.

## 8.8 Statistische Auswertung

Ausgewertet wurden die Daten mit dem Statistikprogramm SPSS 11.0. Die verschiedenen Parameter wurden ab einer Gruppengröße von sieben und mehr Tieren im Boxplot und bei einer geringeren Fallzahl im Streudiagramm dargestellt.

Bei einem Boxplot stellt der Querstrich in der Box den Median dar, d.h. je 50 % der Fälle liegen oberhalb und unterhalb dieses Wertes. Die Boxen werden durch die Perzentile begrenzt, in diesem Bereich liegen je 25 % der Fälle. Bei einer symetrischen Verteilung sind, im Gegensatz zu einer schiefen Verteilung, der 25 % und 75 % Punkt gleich weit vom Median entfernt. Ausreißer, Werte, die mehr als anderthalb Kastenlängen außerhalb liegen, sind als Punkt <sup>o</sup> dargestellt, die Zahl daneben beschreibt die jeweilige Fallnummer. Besonders weit entfernt liegende Datenpunkte, mehr als drei Kastenlängen außerhalb, werden als Extremwerte mit einem \* gekennzeichnet.

Bei den Streudiagrammen wurden gegebenenfalls übereinander liegende Punkte gejittert.

Von den Parametern der einzelnen Gruppen wurden Median, Minimum, Maximum, 25 und 75 Perzentil angegeben.

Um statistische Unterschiede zwischen dem erkranktem und dem kontralateralem Gelenk aufzudecken, wurde der Wilcoxon Test eingesetzt. Wenn die Überschreitungswahrscheinlichkeit  $p$  kleiner als die vorgegebene Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha = 0,05$  ist, gelten die Gruppen bezüglich der Lage der Verteilung als statistisch unterschiedlich,