

Aus der
Unfall- und Wiederherstellungschirurgie
Charité – Campus Virchow Klinikum
der Humboldt Universität Berlin

eingereicht über die
Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Histologische, immunhistologische und histomorphometrische Untersuchungen
der Wirkung von systemisch appliziertem speziesspezifischem
Wachstumshormon auf einen
osteocondralen Knorpeldefekt am Yucatan-Minischwein

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Petra Klein
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2001

Journal-Nr.: 2523

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. vet. M. Schmidt
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. L. Brunnberg
Zweiter Gutachter: PD Dr. med. M. Raschke
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. R. Rudolph

Tag der Promotion: 19. April 2002

den Schweinen

INHALT

Inhalt	I
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	V
1 Einleitung	1
2 Stand der Wissenschaft	3
2.1 Wachstumshormon	3
2.1.1 Geschichtlicher Überblick	3
2.1.2 Struktur und Wirkungsweise	4
2.1.3 Wachstumsfaktoren	8
2.1.4 Wirkung von Wachstumshormon	14
2.1.5 Einsatz in der Medizin	15
2.1.6 Mögliche Nebenwirkungen einer Wachstumshormonbehandlung	16
2.1.7 Ausblick	18
2.2 Anatomie und Physiologie des Gelenkknorpels	19
2.2.1 Chondrozyten	19
2.2.2 Extrazelluläre Substanz	20
2.2.3 Kalkknorpel	25
2.2.4 Subchondraler Knochen	25
2.2.5 Biomechanische Grundlagen des Gelenkknorpels	25
2.3 Heilung eines osteochondralen Defekts	27
2.3.1 Rahmenbedingungen	27
2.3.2 Mikroskopische Beobachtungen	28
2.4 Möglichkeiten zur Verbesserung der Knorpelheilung	31
2.4.1 Chirurgische Intervention	31
2.4.2 Transplantate	32
2.4.3 Hormone	33
2.4.4 Wachstumsfaktoren	35
2.4.4.1 Wachstumsfaktoren und Frakturheilung	36
2.4.4.2 Wachstumsfaktoren und Knorpeldefekte	37
3 Eigene Untersuchungen	38
3.1 Material	38
3.1.1 Tiere	38
3.1.2 Tierhaltung	38
3.2 Methodik	39

3.2.1	Versuchsanordnung	39
3.2.2	Narkose und Operation	40
3.2.2.1	Operationsvorbereitung	40
3.2.2.2	Operation	42
3.2.2.3	Postoperative Versorgung	45
3.2.3	Weiterer Verlauf	45
3.2.3.1	Haltung	45
3.2.3.2	Applikation von Wachstumshormon/Placebo	45
3.2.3.3	Kontrolle des Heilungsverlaufs	46
3.2.3.4	Ganganalyse	46
3.2.3.5	Polychrome Sequenzmarkierung	47
3.3	Gewinnung und Aufarbeitung der Präparate	48
3.3.1	Tötung und Sektion der Tiere	48
3.3.2	Sägen	48
3.3.3	Fixation	50
3.3.4	Behandlung der Präparate für die histomorphometrische Auswertung	50
3.3.4.1	Dehydrieren	50
3.3.4.2	Einbetten in Methylmetacrylat	50
3.3.4.3	Anfertigen von Schnitten	51
3.3.4.4	Färben der Schnitte	52
3.3.5	Behandlung der Präparate für die Immunhistochemie	53
3.3.5.1	Entkalken mit EDTA-Lösung	53
3.3.5.2	Einbetten in Paraffin	53
3.3.5.3	Anfertigen von Schnitten	53
3.3.5.4	Immunhistologisches Färben der Schnitte	53
3.4	Auswertung	56
3.4.1	Makroskopische Beobachtungen	56
3.4.1.1	Subjektive Beurteilung des Heilungsverlaufs	56
3.4.1.2	Ganganalyse	58
3.4.1.3	Visuelle Beurteilung bei der Explantation	58
3.4.2	Histomorphometrie	58
3.4.2.1	Bildanalyse	58
3.4.2.2	Scoren der Defekte	65
3.4.3	Immunhistochemie	67

3.4.3.1	Mikroskopische Auswertung der Wachstumsfaktoren	67
3.4.3.2	Mikroskopische Auswertung der Gefäßdarstellung	68
4	Ergebnisse	69
4.1	Subjektive Beurteilung des Heilungsverlaufs	69
4.2	Ergebnisse der Ganganalyse	70
4.3	Ergebnisse der visuellen Beurteilung bei der Explantation	72
4.4	Ergebnisse der histomorphometrischen Auswertung	73
4.4.1	Ergebnisse der Bildanalyse	73
4.4.2	Ergebnisse des Scorens	88
4.5	Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung	93
4.5.1	Wachstumsfaktoren	93
4.5.2	Gefäßdarstellung	100
4.6	polychrome Sequenzmarkierung	105
5	Diskussion	106
5.1	Diskussion der Methoden	106
5.1.1	Operation und postoperativer Beobachtungszeitraum	106
5.1.2	Gewinnung und Aufarbeitung der Proben	106
5.1.3	Histomorphometrie	107
5.1.4	Scoring	109
5.1.5	Immunhistochemie	110
5.1.5.1	Wachstumsfaktoren	110
5.1.5.2	Gefäßdarstellung	112
5.2	Diskussion der Ergebnisse	112
5.2.1	Ganganalyse	112
5.2.2	Histomorphometrie	112
5.2.3	Vergleich Histomorphometrie – Scoresysteme	113
5.2.4	Immunhistochemie	114
5.2.4.1	Wachstumsfaktoren	114
5.2.4.2	Gefäßverteilung	114
5.3	Vergleich mit anderen Studien	116
5.3.1	Heilungsverlauf	116
5.3.2	Beeinflussung des Heilungsverlaufs	117
5.3.3	Vergleich mit anderen Methoden	118
5.4	Schlußfolgerung	120

6	Zusammenfassung	121
7	Summary	122
8	Literatur	123
9	Anhang: Makro, KS 400	144
10	Danksagung	151
11	Lebenslauf	152
12	eidesstattliche Erklärung	153

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
bzw.	beziehungweise
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
d	Tag
Da	Dalton
EKG	Elektrokardiogramm
<i>GH</i>	<i>Growth hormone</i> = Wachstumshormon
h	Stunde
I.E.	Internationale Einheit
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
µg	Mikrogramm
m	Meter
min	Minuten
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
ml	Milliliter
MPa	Megapascal
NaCl	Natriumchlorid
n.s.	nicht signifikant
RGB	Rot-Grün-Blau
resp.	respektive
Std.abw.	Standardabweichung
Vol%	Volumenprozent
z.B.	zum Beispiel

10 DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Professor Leo Brunnberg für die Möglichkeit, auf diesem mir bis dahin völlig unbekanntem Gebiet der Forschung Erfahrungen zu sammeln und die damit verbundene großzügige Freistellung vom klinischen Arbeitsalltag.

Herrn PD Dr. Michael Raschke danke ich für die Überlassung des Themas. Er gab mir die Möglichkeit, einmal über den „tierärztlichen Tellerrand“ zu schauen.

Herrn Dr. Hermann Bail danke ich für die wissenschaftliche Anleitung und Betreuung bei der Planung, Durchführung und Auswertung meiner Arbeit. Desweiteren möchte ich ihm für seine prompte und immer konstruktive Kritik und die sich daraus ergebenden Diskussionen bei der Entstehung des Manuskriptes danken.

Gabriele Hardung und Marzena Princ danke ich für die ständige und geduldige histologische Anleitung und Hilfe, richtungsweisende Gespräche und guten Kaffee.

Nicht zuletzt möchte ich Julia Funk und Jörn Seebeck danken, die unermüdlich jede Version des Manuskriptes aufs Neue lasen, dabei immer offen und ehrlich Kritik übten und doch nie die gute Laune verloren.

Danken möchte ich auch all meinen Mitdoktoranden, die gemeinsame Arbeit mit Ihnen hat mir viel Spaß gemacht und half manchen schweren Abschnitt zu bewältigen.

11 LEBENS LAUF**Petra Klein**

- 26. Juli 1971** geboren in Berlin
- 1977 - 1981** Münchhausen-Grundschule, Berlin
- 1981 - 1990** Evangelische Schule Frohnau, Berlin
- 1991 – 1997** Studium der Veterinärmedizin an der Freie Universität Berlin
- 7. Juli 1997** III. Staatsexamen
- August 1997** Beginn der Promotionsarbeit
an der Unfall-und Wiederherstellugschirurgie
Charité, Campus Virchow-Klinikum
- seit 1. Juli 1999** wissenschaftliche Mitarbeiterin
Forschungslabor der Unfall-und Wiederherstellugschirurgie
Charité, Campus Virchow-Klinikum

12 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, daß die vorliegende Dissertationsschrift von mir selbst und ohne Hilfe Dritter verfaßt wurde. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Ich versichere, keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Literaturstellen verwendet zu haben.

Berlin, den 3. Mai 2001

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Petra Klein'. The signature is written in a cursive style with a large initial 'P' and a long horizontal stroke at the end.

(Petra Klein)