

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Entwicklung der Arthrose anhand von Bildern

Bei STR/ort Mäusen entwickelt sich die Kniegelenksarthrose regelmäßig im Laufe ihres Lebens. Zur histologischen Untersuchung wurden Mäuse beiderlei Geschlechts im Alter von 10, 20, 30 und 40 Wochen getötet. Insgesamt standen 18 männliche und 20 weibliche Tiere zur Verfügung. Die Kniegelenke wurden präpariert, entkalkt und in Parafin eingebettet. Die arthrotischen Veränderungen ließen sich histologisch am besten am Schnitt in frontaler Ebene beurteilen. An immunhistochemischen Präparaten konnte gezeigt werden, wie der Knorpel sich mit zunehmendem Alter verändert und welcher Zusammenhang zwischen der Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren besteht.

#### 4.1.1 Gelenkausschnitt und positive Färbung

Abbildung 4 zeigt schematisch ein normales Kniegelenk im Frontalschnitt mit Tibia und Femur sowie den Gelenkspalt mit der Gelenkkapsel und den Menisken an der Seite und den Kreuzbändern in der Mitte. Für die Arthrose ist der Gelenkknorpel wichtig, der die Knochenenden überzieht und die Belastung der Druck- und Scherkräfte aufnimmt, die bei der Bewegung zwischen den Röhrenknochen auftreten. In der Spongiosa der Röhrenknochen sind die Epiphysenfugen zu sehen, die ebenfalls aus Knorpel bestehen. Die Synovialis kleidet von innen die Gelenkkapsel aus und produziert die Gelenkschmiere.

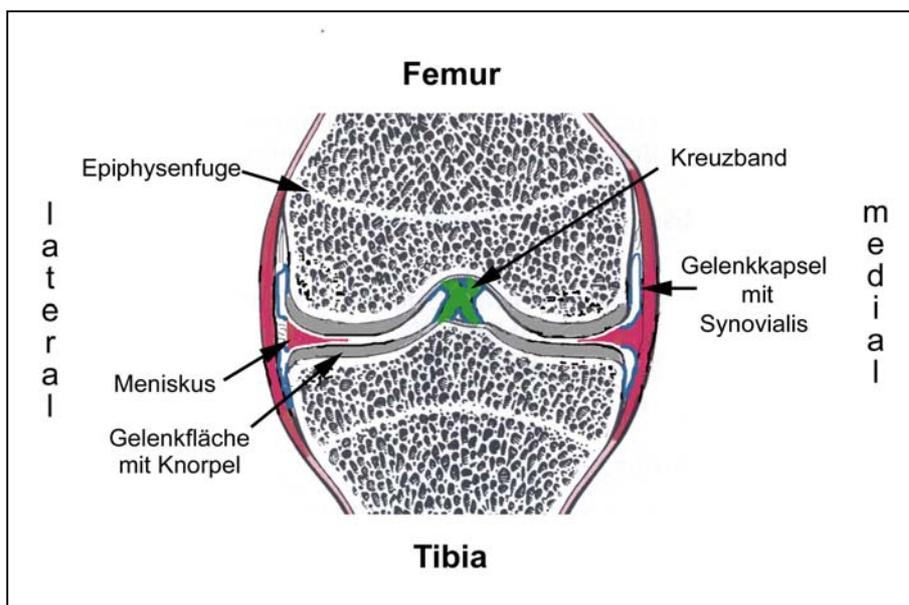


Abb. 4: schematische Kniegelenksübersicht, eines rechten Knies

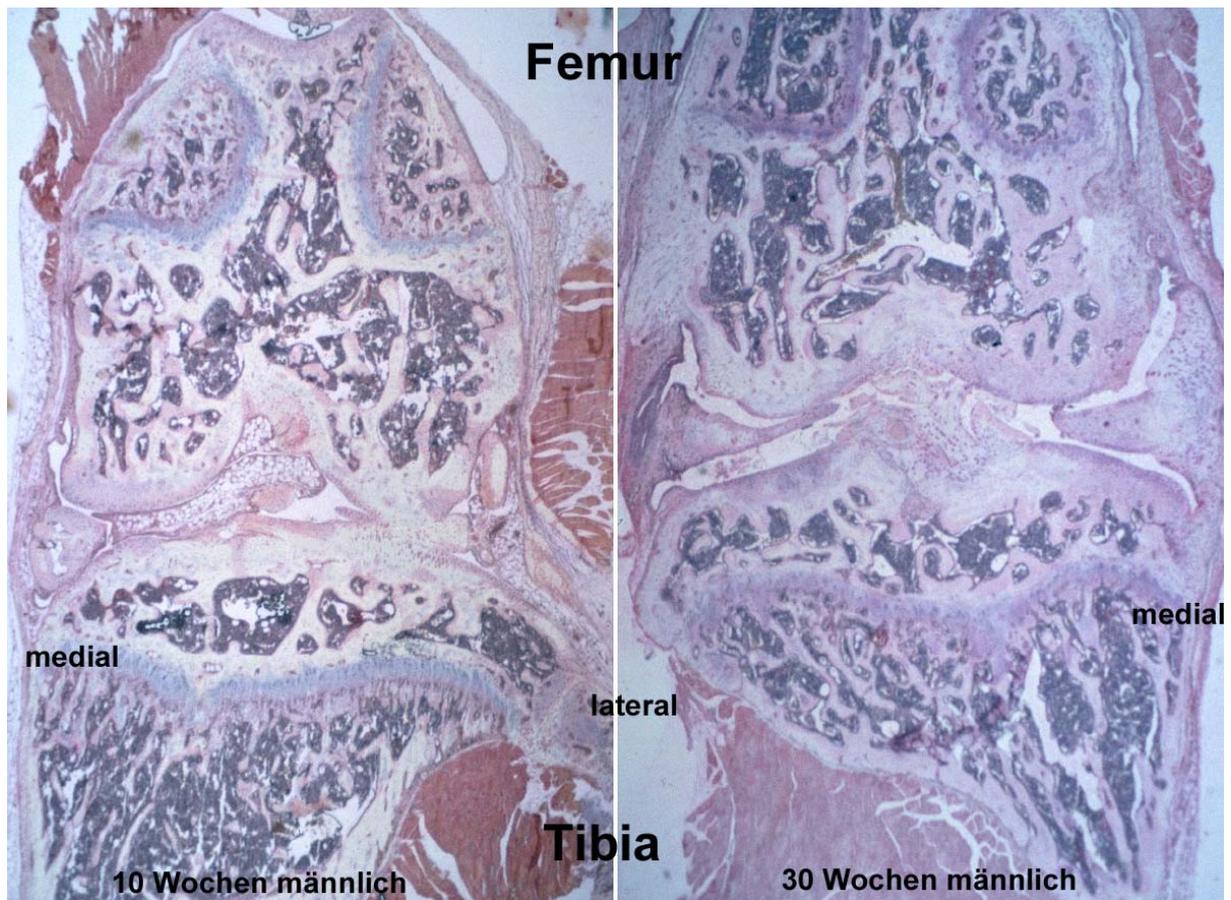


Abb. 5: 10 Wochen alte männliche Maus (Nr. 4) und 30 Wochen alte männliche Maus (Nr. 3)

Auf Abbildung 5 ist links der Schnitt des Knies einer 10 Wochen alten männlichen Maus und rechts der Schnitt des Knies einer 30 Wochen alten männlichen Maus gezeigt. Der Schnitt der jüngeren Maus ist aus einem weiter ventral gelegenen Bereich des Gelenks als der Schnitt bei der älteren Maus. Bei der jüngeren ist der mediale Meniskus nur teilweise angeschnitten und die Kreuzbänder sind nicht getroffen. Eine typische Veränderung für die Arthrose ist die Verdickung der Synovialis. Bei der jüngeren Maus sind mediale und laterale Synovialis noch gleich dick, bei der älteren ist bereits eine deutliche Verdickung der medialen Synovialis zu erkennen.

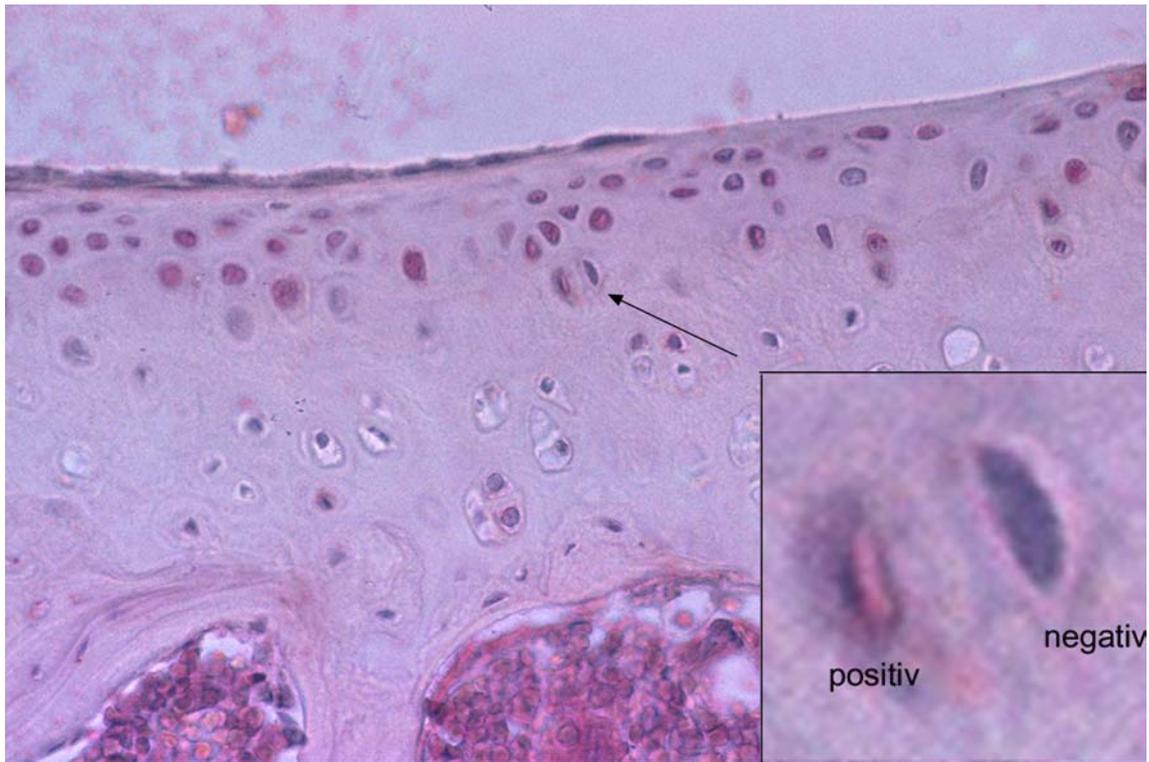


Abb. 6: 20 Wochen alte männliche Maus (Nr. 2), Nachweis positiver Färbung: rötliche Zellen exprimieren TGF $\beta$ , bläuliche nicht.

Abbildung 6 zeigt die TGF $\beta$  Färbung von Chondrozyten in einem Schnitt durch das Tibiaplateau eines Tieres als Beispiel. Auf dem Ausschnitt sieht man zwei nebeneinanderliegende Zellen, wobei die linke TGF $\beta$  exprimiert, d.h. rötlich gefärbt ist, und die andere kein TGF $\beta$  exprimiert, also nur mit Hematoxylin blau gegengefärbt ist. Die Färbungen der anderen Zytokine waren in der Regel ähnlich.

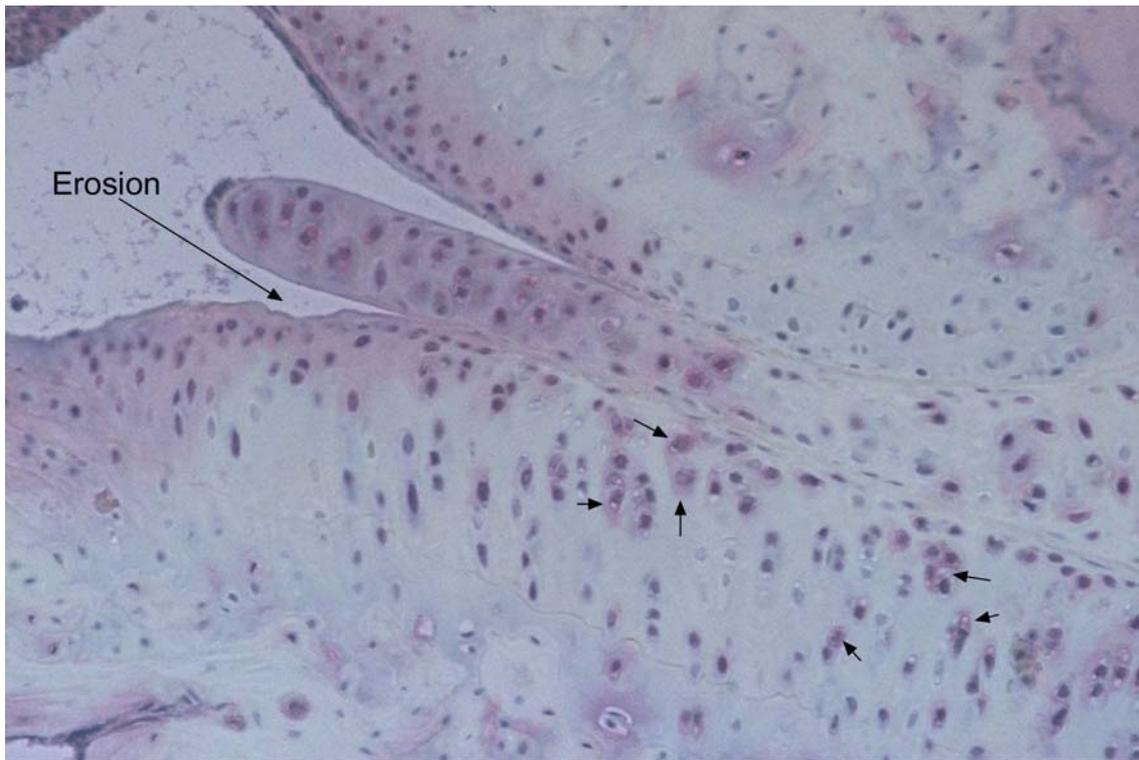


Abb.7: 10 Wochen alte männliche Maus (Nr. 4), normale Knorpelstruktur, einige TGFβ positive Zellen mit Pfeilen markiert

In Abbildung 7 ist der Knorpel in seiner ursprünglichen Form bei einer 10 Wochen alten männlichen Maus zu sehen. Die untere Gelenkfläche ist wieder die Tibia, von rechts ragt der Meniskus in den Gelenkspalt und die obere Gelenkfläche bildet der Femur. Der tibiale Knorpel zeigt hier noch deutlich die typischen vier Zonen: Oberflächliche Tangentialfaserzone, hier liegen die Zellen parallel zur Oberfläche; nachfolgend die Übergangszone; dann die Radiärfaserschicht, wo die Fasern senkrecht zur Oberfläche verlaufen und die Knorpelzellen in Säulen dazwischen liegen und zum Schluss die knochennahen Zellen, die von den anderen Zonen durch die sogenannte Tidemark getrennt sind. Letztere ist hier als dünne Wellenlinie zu erkennen ist. Obwohl die Maus erst 10 Wochen alt ist, zeigt sie am linken Rand eine kleine Erosion der oberflächlichen Schicht. Die Abbildung macht deutlich, dass schon in 10 Wochen alten Mäusen eine erhöhte TGFβ Expression vorhanden ist.

### 4.1.2 Knorpeldestruktion

Die nächsten Abbildungen demonstrieren die fortschreitende Knorpelzerstörung. Sie beginnt mit einer langsamen Auflösung der oberflächlich glattbegrenzten Schicht (Abbildung 8). Die Säulenstruktur ist ungeordnet und die Zellen liegen in Chondronen enger zusammen. Der Schnitt ist vom lateralen Tibiaplateau einer 40 Wochen alten weiblichen Maus und zeigt einen geringen Grad der Knorpelzerstörung. Der von der Ausprägung her unterschiedlich starke Befall der Gelenke gleichaltriger Tiere erschwert die Auswertung der Veränderungen in Bezug auf das Alter der Tiere.

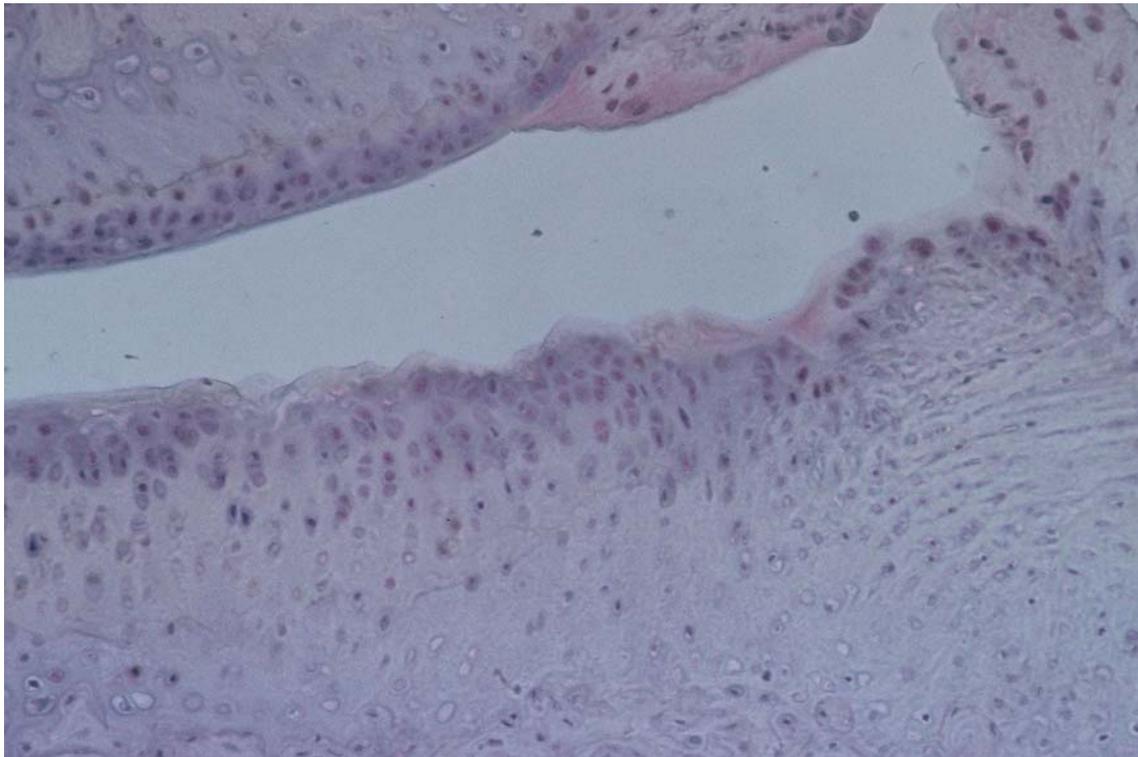


Abb. 8: 40 Wochen alte weibliche Maus (Nr. 5), laterales Tibiaplateau, erstes Stadium der Knorpeldestruktion

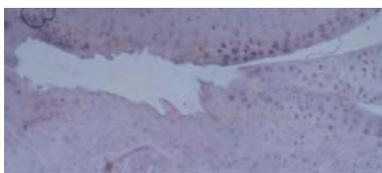


Abb. 9: 40 Wochen alte weibliche Maus (Nr. 5), mediales Tibiaplateau, Fibrillen und Fissuren bei Knorpeldegeneration

In der Abbildung 9 erkennt man eine zunehmende Auflösung der oberflächlichen Schicht mit den für die Arthrose typischen Fibrillen und Fissuren. Dieser Schnitt ist von der gleichen Maus, wie der aus Abbildung 8, nur aus dem medialen Tibiaplateau. Die stärkere Ausprägung des Knorpelabbaus im medialen im Vergleich zum lateralen Tibiaplateau, wie bereits in der Literatur beschrieben wurde (Sokoloff 1956), ist hier eindrucksvoll belegt.

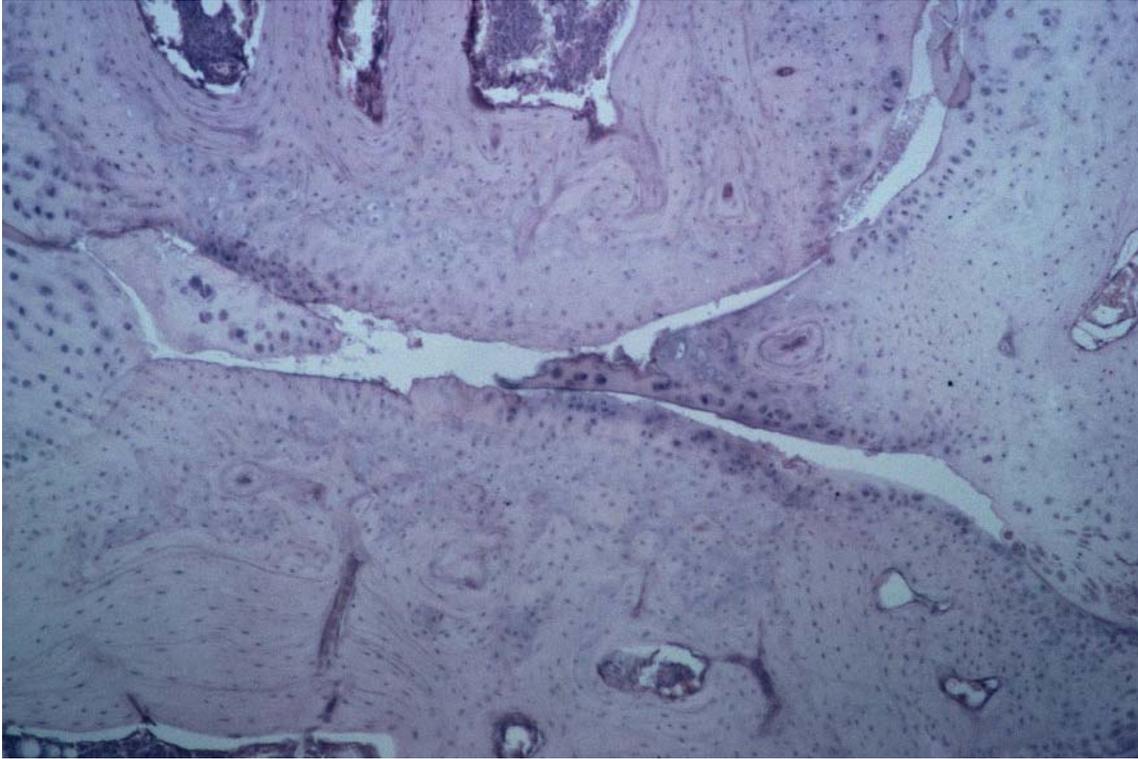


Abb. 10: 30 Wochen alte weibliche Maus (Nr. 3), zunehmende Knorpeldestruktion

In Abbildung 10 ist der zunehmende Knorpelverlust dargestellt, der nicht nur den Gelenkknorpel sondern auch die Menisken betrifft. Es kommt dabei gehäuft zu knorpelähnlichen Resten im Gelenkspalt. An der seitlichen bindegewebigen Verdickung ist gut zu erkennen, dass auch die Gelenkkapsel nicht verschont bleibt.

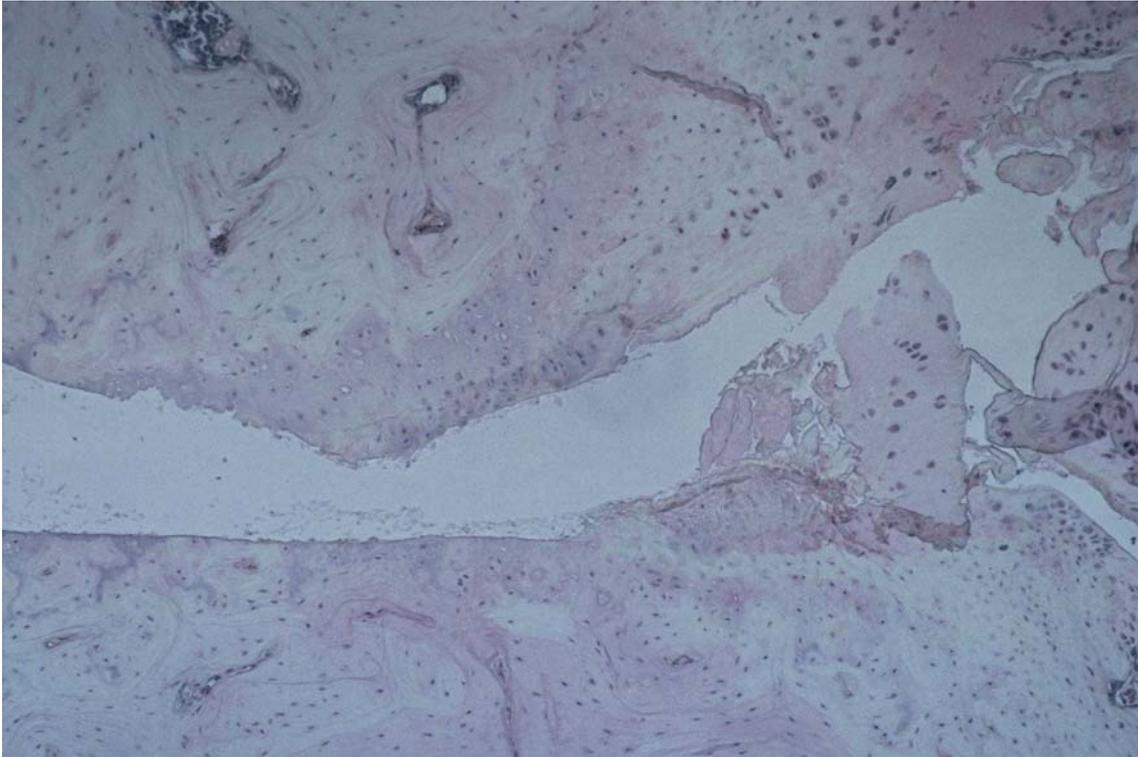


Abb. 11: 40 Wochen alte männliche Maus (Nr. 4), Knorpelverlust als Endstadium der Zerstörung

In der letzten Abbildung 11 zum Knorpelabbau sieht man, dass der Knorpel der tibialen und femoralen Gelenkfläche vollkommen fehlt und der Meniskus in Form und Struktur stark verändert ist. Die Menisken zeigen in diesem Stadium häufig eine verminderte Zellzahl, eine aufgeraute Oberfläche und den Verlust ihrer Form. Sie nehmen am arthrotischen Prozess teil und verlieren im Laufe der Erkrankung ihre Funktion.

### 4.1.3 Bindegewebsbeteiligung

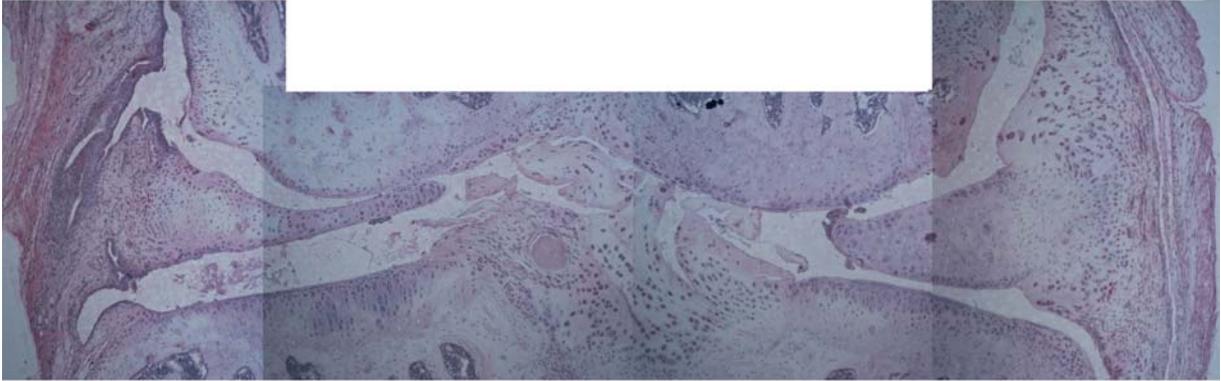


Abb. 12: 30 Wochen alte männliche Maus (Nr. 3), Gelenkübersicht mit deutlicher Bindegewebsbeteiligung, (links = lateral, rechts = medial)

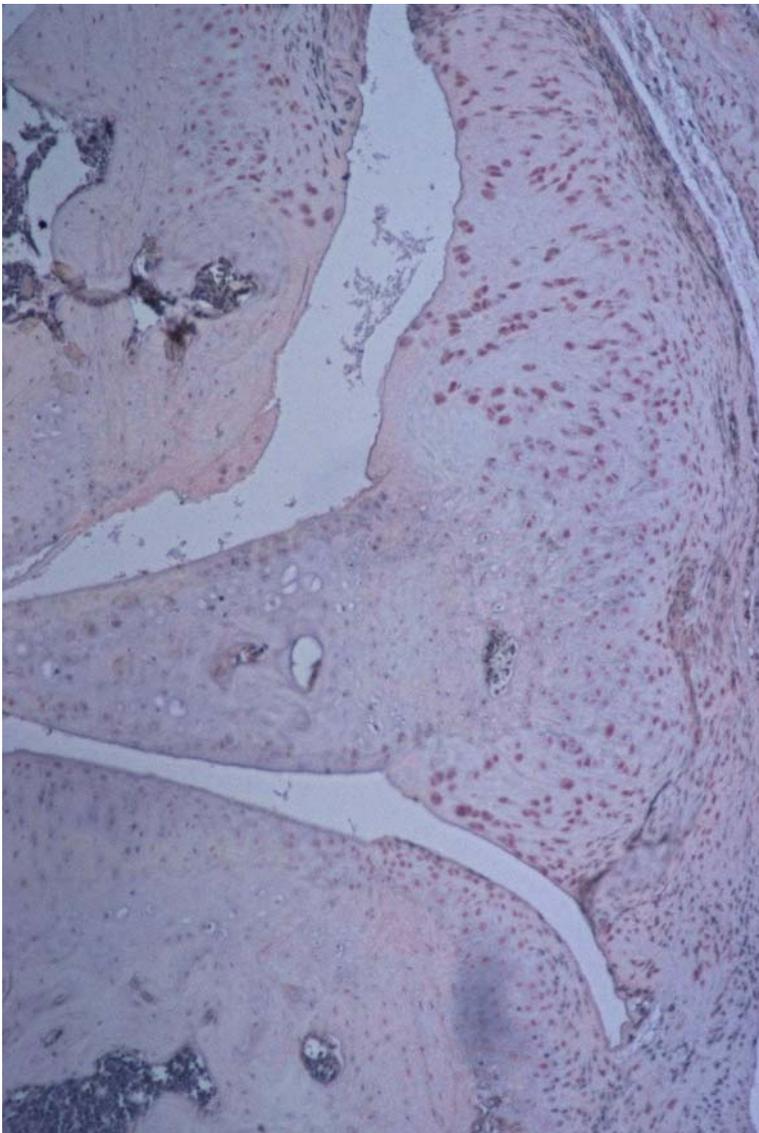


Abb. 13: 30 Wochen alte männliche Maus (Nr. 3), Ausschnitt des medialen Meniskus und der medialen Synovialis

Die nächsten beiden Abbildungen (12 und 13) sind aus dem gleichen Gelenk eines 30 Wochen alten Männchens, wobei in Abb. 12 eine IL-6 Färbung und in Abb. 13 eine TGF $\beta$  Färbung gezeigt ist.

In Abbildung 12 ist im Vergleich von lateraler und medialer Synovialis eine Bindegewebsvermehrung der medialen Synovialis gut zu erkennen. Vergleichsweise zeigt sich die laterale Synovialis zwar zellreich, aber keineswegs verdickt.

Für beide Zytokine kann in diesen beiden Abbildungen gezeigt werden, dass sie besonders stark in dem Gewebe exprimiert sind, das den medialen Meniskus mit der Synovialis verbindet. Es ist vorstellbar, dass hier eine Entzündungsreaktion abgelaufen ist. Da die Schnitte nicht zusammenhängen, ist nicht feststellbar, ob nun dieselbe Zelle IL-6 und TGF $\beta$  produziert. Da aber beide Zytokine im gleichen Bereich exprimiert werden, ist es wahrscheinlich, dass die Expression beider Zytokine irgendwie zusammenhängt. Vermutlich geht die destruktive Reaktion nicht alleine vom Knorpel aus. Auch die Synovialis bildet Mediatoren, die über Diffusion den Knorpelstoffwechsel beeinflussen.

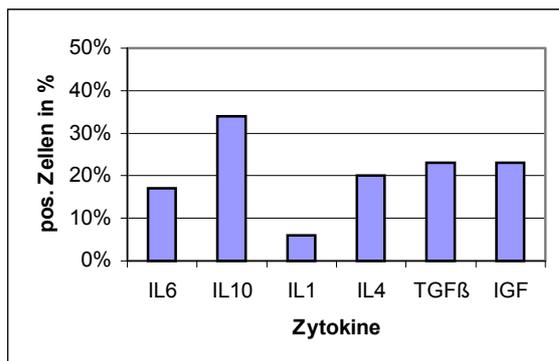


Abbildung 14: Zytokinexpression der 30 Wochen alten männlichen Maus (Nr. 3) aus Abb. 6, 12 und 13

## 4.2 Zytokinexpression im Vergleich

Es konnte für alle untersuchten Zytokine und Wachstumsfaktoren anhand von immunhistochemischen Färbungen eine Expression in den Chondrozyten und somit zum ersten Mal eine Zytokinexpression auf Proteinebene von STR/ort-Mäusen gezeigt werden. Die Abhängigkeit der Expression vom Lebensalter zu zeigen, war dadurch erschwert, dass für jedes Ergebnis eine Maus getötet werden musste. Damit war es nicht möglich, den Verlauf der Zytokinexpression am einzelnen Tier zu zeigen. Andererseits zeigen unsere Untersuchungen, dass die Zytokinexpression von Maus zu Maus sehr unterschiedlich ist. Auf RNA Ebene haben Chambers et al.

(Chambers, Bayliss et al. 1997) bereits eine unterschiedlich starke Expression von Zytokinen beschrieben. Der Proteinnachweis ist technisch noch störanfälliger. Abgesehen von methodischen Schwierigkeiten mit dem Zytokinnachweis ist aber auch das Ausmaß der Knorpeldestruktion von Maus zu Maus gleichen Alters unterschiedlich stark ausgeprägt.

Insgesamt wurden vier Zytokine und zwei Wachstumsfaktoren untersucht. Bei allen sieht man die Tendenz, dass im Laufe der Erkrankung die Expression abnimmt. Lediglich bei IL-6 und TGF $\beta$  war der Verlauf eindeutig darstellbar. Die anderen Zytokine unterlagen großen Schwankungen, die vermutlich methodisch bedingt waren. Die Zytokine werden vermehrt in Bereichen gebildet, wo die Belastung nicht so groß ist, d.h. an den lateralen und medialen Seiten der Gelenkflächen. Auch in dem umliegenden Bindegewebe findet sich eine hohe Expression der Zytokine IL-10, IL-6, IL-1 und IGF-1. IL-4 und TGF $\beta$  hingegen werden mehr im Knorpel selbst exprimiert.

#### 4.2.1 Übersicht über die männlichen STR/ort Mäuse

In den beiden folgenden Tabellen sind die einzelnen Mäuse mit den auswertbaren bzw. nicht auswertbaren Färbungen für jedes Zytokin gezeigt.

	TGF $\beta$	IL-6	IL-1 $\beta$	IL-4	IL-10	IGF
10 Wochen 1	+	+	+	+	+	+
10 Wochen 2	+	+	+	+	+	+
10 Wochen 3	+	+	+	+	+	+
10 Wochen 4	+	+	+	+	+	+
20 Wochen 1	+	+	+	+	+	+
20 Wochen 2	+	+	+	+	+	-
20 Wochen 3	+	+	+	+	+	+
20 Wochen 4	+	+	+	+	+	+
20 Wochen 5	+	+	+	+	+	+
30 Wochen 1	+	+	+	+	+	+
30 Wochen 2	+	+	+	+	+	+

30 Wochen 3	+	+	+	+	+	+
30 Wochen 4	+	+	+	+	+	+
30 Wochen 5	+	+	+	+	+	+
40 Wochen 1	+	+	+	-	+	+
40 Wochen 2	+	+	+	-	+	+
40 Wochen 3	+	+	+	-	+	+
40 Wochen 4	+	+	+	-	+	+

+ Färbung war auswertbar, - Färbung war nicht auswertbar

#### 4.2.2 Übersicht über die weiblichen STR/ort Mäuse

	TGF $\beta$	IL-6	IL-1 $\beta$	IL-4	IL-10	IGF
10 Wochen 1	+	+	+	+	+	+
10 Wochen 2	+	+	+	+	+	+
10 Wochen 3	+	+	+	+	+	+
10 Wochen 4	+	+	+	+	+	+
10 Wochen 5	+	+	+	+	+	+
20 Wochen 1	+	+	+	+	+	+
20 Wochen 2	+	-	+	+	-	+
20 Wochen 3	+	+	+	+	+	+
20 Wochen 4	+	+	+	+	+	+
20 Wochen 5	+	+	+	+	+	+
30 Wochen 1	+	+	+	+	-	+
30 Wochen 2	-	+	+	+	+	+
30 Wochen 3	+	+	+	+	+	+
30 Wochen 4	-	+	+	+	+	+
30 Wochen 5	+	+	+	+	+	+
40 Wochen 1	+	+	+	-	+	+
40 Wochen 2	+	+	+	-	+	+
40 Wochen 3	+	+	+	-	+	+

40 Wochen 4	+	+	+	-	+	+
40 Wochen 5	+	+	+	-	+	+

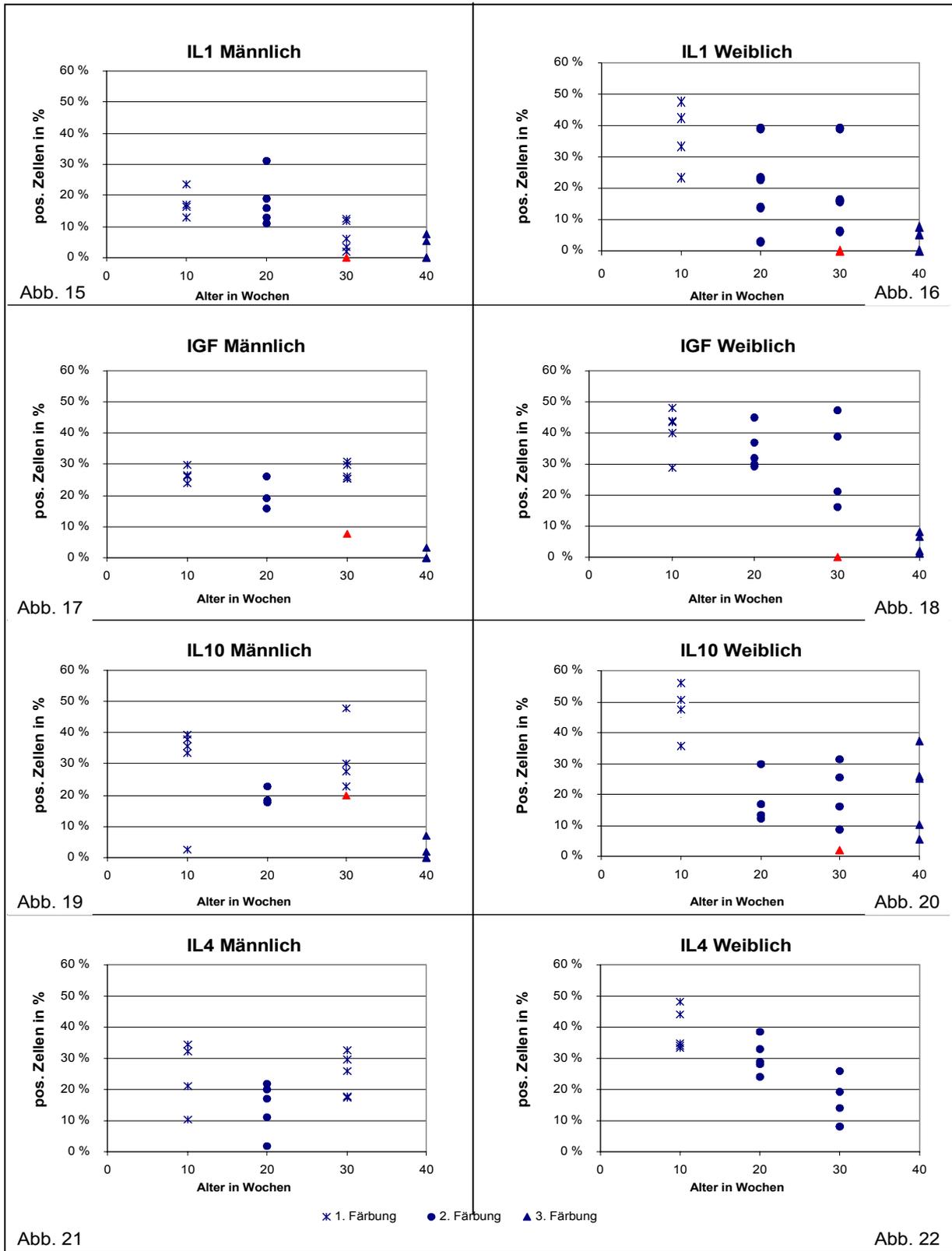
+ Färbung war auswertbar, - Färbung war nicht auswertbar

#### 4.2.3 Die Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10 und der Wachstumsfaktor IGF-1

In den Abbildungen 15-22 sind die Zytokine IL-1, IL-4, IL-10 und der Wachstumsfaktor IGF-1 dargestellt. Es ist insgesamt für alle Zytokine eine Abnahme der Expression zu erkennen.

Da nicht alle Präparate auf einmal gefärbt werden konnten, wurden die Färbungen zu drei verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Diese sind in den Abbildungen mit einem Stern für den ersten, einem Punkt für den zweiten und mit einem Dreieck für den dritten Durchgang gekennzeichnet.

Jede Markierung stellt, wie unter 3.2.6 beschrieben, den Mittelwert der Auszählungen an einer Maus dar. Da keine Serien-Schnitte gemacht wurden, ist nicht ausgeschlossen, dass der Knorpel im ventralen Bereich des Gelenks mehr verändert ist als im dorsalen, und dass ein Unterschied in der Zytokinexpression zwischen ventralem und dorsalem Gelenkknorpel besteht.



Abbildungen 15 – 22 : Expression von IL-1 $\beta$ , IGF1, IL-10 und IL-4 im Knie, jeweils für die männlichen und weiblichen STR/ort Mäuse. Jede Markierung zeigt den Mittelwert der prozentual positiven Zellen des Knorpels der tibialen Gelenkflächen einer Maus. Der Stern steht für die erste Färbung, der Punkt für die zweite und das Dreieck für die dritte.

Man sieht quantitative Unterschiede der Zytokinexpression in den drei Färbungen. Die erste Färbung (Stern) zeigt insgesamt eine etwas höhere Zytokinexpression. Dies betrifft bei den Männchen die 10- und 30 Wochen alten und bei den Weibchen nur die 10 Wochen alten Tiere. Bei der zweiten Färbung (Punkt) wurden Präparate von 20 Wochen alten Männchen und von 20 und 30 Wochen alten Weibchen gefärbt. Die dritte Färbung (Dreieck) betrifft die 40 Wochen alten Männchen und Weibchen, wobei diese Färbung ein Jahr nach den ersten beiden gemacht wurde. Die roten Dreiecke betreffen Tiere, von denen Präparate in der dritten Färbung zur Kontrolle ein zweites Mal mitgefärbt wurden, um zu sehen, ob die Färbungen unterschiedlich ausfallen. Die Präparate eines 30 Wochen alten Männchens und eines 30 Wochen alten Weibchens wurden zur Kontrolle nochmals mitgefärbt. Für IGF, einen polyklonalen Antikörper, der nach einem Jahr aus einer anderen Charge stammte, konnten die Zweifel nicht ausgeräumt werden, dass die neue Charge schlechter reagiert hat.

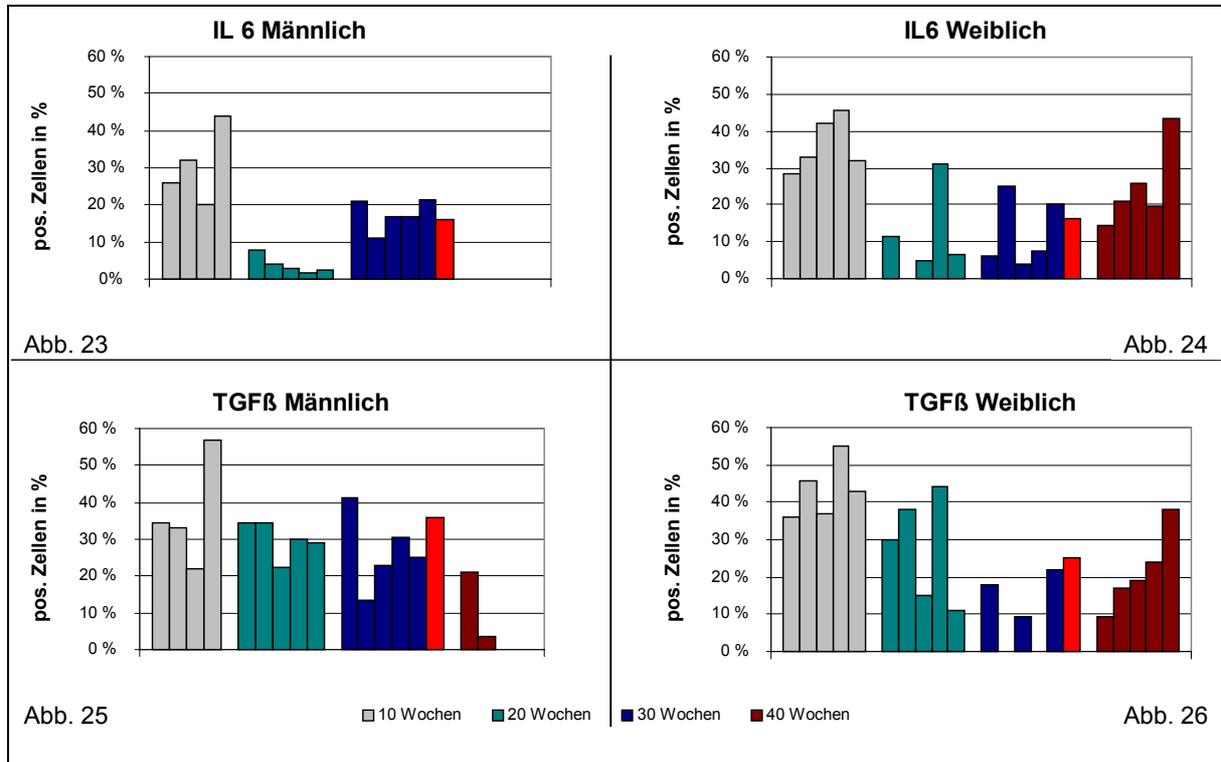
In den Abbildungen 15 -22 ist zu erkennen, dass in allen Fällen eine Zytokin- und Wachstumsfaktorenexpression nachweisbar ist. Die Expression nimmt mit dem Alter der Mäuse insgesamt ab. Ein Gipfel der Zytokinexpression ist nicht erkennbar, vermutlich weil zum Zeitpunkt der ersten Messung der Peak schon erreicht bzw. überschritten war.

Von den Weibchen werden im gleichen Alter mehr Zytokine und Wachstumsfaktoren exprimiert als von Männchen. Dies erkennt man an den 10 Wochen alten Weibchen bei den Färbungen von IL-10 mit einem Mittelwert von 47 % im Vergleich zu den Männchen mit einem Mittelwert von 37 %. Deutlicher ist das an der Färbung für IL-1 mit 34 % für die Weibchen und annähernd der Hälfte, nämlich 18 % für die Männchen zu sehen. Dieselbe Tendenz ist bei IL-4 und dem Wachstumsfaktor IGF zu erkennen.

Die zweite Schlussfolgerung, die Abnahme der Zytokinexpression, ist an IL-1 gut zuerkennen: bei 10 Wochen alten Weibchen mit einem Mittelwert von 34 % , der bei 20 Wochen alten auf 20 %, bei 30 Wochen alten auf 15 % und schließlich bei 40 Wochen alten auf 10 % und bei den Männchen von 17 % mit 10 Wochen, auf 18 % mit 20 Wochen, mit 30 Wochen auf 7 % und mit 40 Wochen auf 3 % sinkt. Wie bei IL-1 Männlich zu sehen, ist der leicht erhöhte Mittelwert der 20 Wochen alten Mäuse auf eine einzelne Maus zurückzuführen, was wieder die unterschiedlich starke Zytokinexpression im gleichen Alter demonstriert. Zusammenfassend ist an diesen 8

Abbildungen dargestellt, dass Weibchen vergleichsweise mehr Zytokine exprimieren als Männchen, und dass mit zunehmendem Alter bei den STR/ort-Mäusen die Zytokin- und Wachstumsfaktorexpression abnimmt.

#### 4.2.4 Wachstumsfaktor TGF $\beta$ und Zytokin IL-6



Abbildungen 23 –26: Expression von IL-6 und TGF $\beta$ , jede Maus ist jeweils durch einen Balken repräsentiert, der erste Balken pro Zeiteinheit zeigt Maus (Nr. 1), der zweite Maus (Nr. 2) usw.

In den Abbildungen 23-26 ist die Wachstumshormonexpression für TGF $\beta$  und die Zytokinexpression für IL-6 dargestellt. Jeder Balken zeigt eine Maus, wobei es sich um Mittelwerte, die wie die Markierungen in Abbildung 15-22 (wie in 3.2.6 beschrieben) ermittelt wurden. Hier stammen wieder die Werte der 10 und 30 Wochen alten Männchen und die der 10 Wochen alten Weibchen aus der ersten Färbung und die der 20 Wochen alten Männchen und der 20 und 30 Wochen alten Weibchen aus der zweiten Färbung. Die Werte der 40 Wochen alten Männchen und Weibchen sind ebenso wie die Werte der hellroten Säulen der 30 Wochen alten Weibchen und Männchen aus der dritten Färbung.

An diesen Abbildungen kann man, wie oben beschrieben, erkennen, dass die Weibchen eine höhere Zytokin- und Wachstumsfaktorexpression haben und die Expression im Laufe des Lebens abnimmt. IL-6, eines der knorpelabbauenden

Zytokine, zeigt bei den jüngeren Mäusen eine deutliche, allerdings unterschiedliche Expression. Darüber hinaus zeigen Tiere innerhalb einer Geschlechts- und Altersgruppe stark differierende Werte eines Zytokins. Zum Beispiel zeigte die weibliche Maus (Nr. 4) im Alter von 10 Wochen höhere Expression von IL-6 und TGF $\beta$  sowie, hier nicht dargestellt, von IL-1, IL-10, IL-4 und IGF. Andere Tiere wie die weibliche Maus (Nr. 3) zeigten im Alter von 30 Wochen insgesamt niedrigere Zytokinwerte. Es lassen sich noch weitere ähnliche Beispiele finden. Sie zeigen, dass die Zytokinproduktion individuell unterschiedlich ist. Erst bei einer großen Zahl von Individuen lassen sich altersabhängige Trends deutlich belegen.

Bei den 40 Wochen alten Mäusen ist auf Grund der vorangeschrittenen Arthrose teilweise kein Knorpel mehr auf den Gelenkflächen (siehe Abb.12), so dass die Auswertung von positiven Zellen nicht mehr möglich war.

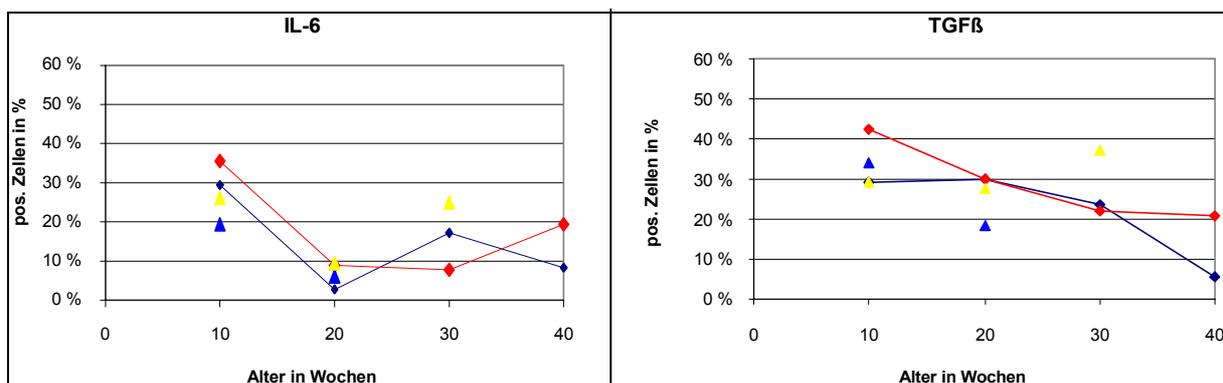


Abbildung 27 und 28: Mediane der einzelnen Altersstufen, rote Raute Weibchen, blaue Raute Männchen, gelbe und blaue Dreiecke Balb/c Mäuse

In den Abbildungen 27 und 28 sind die Mediane aus den Werten von jeweils 5 Weibchen und die Mediane aus den Werten von jeweils 4 - 5 Männchen der STR/ort Mäuse aufgetragen, die im Detail in Abbildung 23-26 dargestellt wurden. Die dreieckigen Markierungen sind von einem anderen Mausstamm, den Balb/c Mäusen. Diese wurden mitgefärbt, um zu sehen, ob nur die STR/ort Mäuse im Gelenkknorpel Zytokine exprimieren. An den Punkten ist deutlich erkennbar, dass auch dieser andere Mausstamm Zytokine exprimiert. Bei der histologischen Untersuchung dieser Balb/c Mäuse konnte kaum Knorpelzerstörung gefunden werden. Die Zytokin- und Wachstumsfaktorenexpression im Gelenkknorpel war geringer als die der STR/ort Mäuse.