

Aus dem  
Veterinärwissenschaftlichen Department  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Univ.-Prof. Dr. med. vet. M. Stangassinger

Angefertigt am  
Institut für Physiologie des Universitätsklinikums  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
(PD Dr. med. M. K. Böttger)

## **Etablierung und Validierung eines Tiermodells für Hämophilie-assoziierten Gelenkschmerz**

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

von  
Susanne Renate Evelyn Krucker  
aus Dachau

München 2012

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Stangassinger

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Köstlin

Tag der Promotion: 11. Februar 2012

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>SCHRIFTTUM ZUR HÄMOPHILIE</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Ätiologie und klinische Aspekte</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2</b>	<b>Vorkommen beim Tier</b> .....	<b>8</b>
<b>2.3</b>	<b>Pathophysiologie der Blut-induzierten Arthropathie</b> .....	<b>10</b>
2.3.1	Aktuelles Konzept der Pathogenese .....	10
2.3.2	Veränderungen der Synovialmembran .....	12
2.3.3	Veränderungen im Gelenkknorpel .....	13
<b>2.4</b>	<b>Schmerz und Hämophilie</b> .....	<b>16</b>
2.4.1	Neuronale Grundlagen des Gelenkschmerzes .....	16
2.4.2	Periphere und zentrale Sensibilisierung .....	17
<b>2.5</b>	<b>Etablierte Tiermodelle</b> .....	<b>19</b>
<b>2.6</b>	<b>Zielsetzung</b> .....	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>23</b>
<b>3.1</b>	<b>Versuchstiere</b> .....	<b>23</b>
<b>3.2</b>	<b>Haltung und Fütterung</b> .....	<b>23</b>
<b>3.3</b>	<b>Allgemeiner Versuchsablauf</b> .....	<b>24</b>
3.3.1	Gruppeneinteilung .....	24
3.3.2	Zeitlicher Ablauf .....	25
3.3.2.1	Einmalige Injektion.....	26
3.3.2.2	Mehrmalige Injektion.....	27
<b>3.4</b>	<b>Versuchstechnische Maßnahmen zur Einleitung einer Blut-induzierten Arthropathie</b> .....	<b>28</b>
3.4.1	Kurzarkose.....	28
3.4.2	Blutentnahme.....	28
3.4.3	Intraartikuläre Kniegelenks-Injektion .....	29
3.4.3.1	Autologes Vollblut .....	29

3.4.3.2	Autologe Blutbestandteile .....	30
3.4.3.3	Kontrollgruppen .....	31
<b>3.5</b>	<b>Messungen am etablierten Modell .....</b>	<b>32</b>
3.5.1	Kniegelenkschwellung und Körpergewicht.....	32
3.5.2	Testung des schmerz-assoziierten Verhaltens .....	33
3.5.2.1	Messung der primären mechanischen Hyperalgesie .....	34
3.5.2.2	Messung der sekundären mechanischen Hyperalgesie .....	36
3.5.2.3	Messung der sekundären thermischen Hyperalgesie .....	38
3.5.2.4	Dynamische Testung durch Bewertung des Gangbildes .....	40
3.5.2.5	Testung mittels einer Score-Vorgabe .....	42
3.5.2.6	Statische Testung .....	42
<b>3.6</b>	<b>Finale Blut- und Gewebeentnahme sowie Tötung der Versuchstiere..</b>	<b>44</b>
3.6.1	Serumgewinnung.....	45
3.6.2	Rat C-Reactive Protein (CRP) - Analyse mittels ELISA.....	45
3.6.3	Entnahme der Kniegelenke.....	47
3.6.3.1	Aufarbeitung der Gelenke .....	47
3.6.3.2	Histopathologische Bewertung .....	48
<b>3.7</b>	<b>Statistische Auswertung .....</b>	<b>51</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>53</b>
<b>4.1</b>	<b>Einmalige Injektion von Vollblut (Gruppe 1) und von physiologischer Kochsalzlösung (Kontrollgruppe).....</b>	<b>54</b>
4.1.1	Primäre Hyperalgesie .....	54
4.1.2	Sekundäre Hyperalgesie.....	55
4.1.3	Dynamische Testung durch Bewertung des Gangbildes .....	55
4.1.4	Testung mittels einer Score-Vorgabe .....	56
4.1.5	Statische Testung .....	57
4.1.6	Klinische Entzündungsanzeichen und allgemeine Morbidität .....	58
4.1.7	Histologische Befunde .....	58
<b>4.2</b>	<b>Mehrmalige Injektion von Vollblut (Gruppe 2) und von physiologischer Kochsalzlösung (Kontrollgruppe).....</b>	<b>59</b>
4.2.1	Primäre Hyperalgesie .....	60
4.2.2	Sekundäre Hyperalgesie.....	61
4.2.3	Dynamische Testung durch Bewertung des Gangbildes .....	61



4.2.4	Testung mittels einer Score-Vorgabe .....	62
4.2.5	Statische Testung .....	63
4.2.6	Klinische Entzündungsanzeichen und allgemeine Morbidität .....	64
<b>4.3</b>	<b>Mehrmalige Injektionen einzelner Blutbestandteile (Gruppe 3 und 4) im Vergleich zur mehrmaligen Vollblut-Injektion (Gruppe 2) und Kontrollgruppe .....</b>	<b>65</b>
4.3.1	Primäre Hyperalgesie .....	66
4.3.2	Sekundäre Hyperalgesie.....	66
4.3.3	Dynamische Testung durch Bewertung des Gangbildes .....	67
4.3.4	Testung mittels einer Score-Vorgabe .....	68
4.3.5	Statische Testung .....	69
4.3.6	Entzündungsparameter und allgemeine Morbidität.....	70
4.3.7	Histologische Befunde und CRP-ELISA .....	71
4.3.7.1	Akute und chronische Entzündungsanzeichen .....	71
4.3.7.2	Gelenkdestruktion.....	72
4.3.7.3	CRP-ELISA.....	73
4.3.8	Korrelation der histologischen Befunde mit dem schmerz-assoziierten Verhalten .....	74
4.3.8.1	Entzündung und Verhalten .....	74
4.3.8.2	Gelenkdestruktion und Verhalten.....	74
<b>4.4</b>	<b>Einfluss von Lithium-Heparin .....</b>	<b>76</b>
4.4.1	Primäre und sekundäre Hyperalgesie.....	76
4.4.2	Motorische Verhaltenstests.....	76
4.4.3	Entzündungsparameter und allgemeine Morbidität.....	77
4.4.4	Histologische Befunde .....	77
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>79</b>
<b>5.1</b>	<b>Einmalige und mehrmalige Vollblut-Injektion .....</b>	<b>79</b>
5.1.1	Einmalige Vollblut-Injektion.....	79
5.1.2	Mehrmalige Vollblut-Injektionen.....	84
<b>5.2</b>	<b>Vergleich der Blutbestandteil-Injektion versus der Vollblut-Injektion .</b>	<b>92</b>
<b>5.3</b>	<b>Lithium-Heparinhaltige physiologische Kochsalzlösung .....</b>	<b>96</b>
<b>5.4</b>	<b>Diskussion des Modells .....</b>	<b>99</b>

5.5	Übertragbarkeit und Nutzen des Modells .....	102
5.6	Schlussfolgerung .....	105
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	106
7	SUMMARY .....	108
8	LITERATURVERZEICHNIS .....	110
9	ANHANG .....	139
9.1	Abkürzungsverzeichnis.....	139
9.2	Danksagung .....	141

## 1 EINLEITUNG

Bei der Hämophilie handelt es sich um die häufigste klinisch manifeste hereditäre Koagulopathie bei Mensch (CRAIG et al., 2006) und Tier (MANSELL, 2000). Der genetisch determinierte Mangel an Gerinnungsfaktor VIII (Hämophilie A) bzw. IX (Hämophilie B) führt zur Störung der sekundären Hämostase, die sich in einer generalisierten Blutungsneigung äußert.

Aufgrund der heute in der Humanmedizin üblichen Substitutionstherapie, bei der der jeweilige Gerinnungsfaktor in Form eines Konzentrats intravenös verabreicht wird, sind lebensbedrohliche Komplikationen selten geworden. Allerdings haben weniger als zehn Prozent der Hämophilen weltweit die Möglichkeit einer adäquaten Therapie (BERNTORP et al., 1995), die erforderlich wäre, um sekundäre Komplikationen zu minimieren. Aber selbst bei optimaler Substitutionstherapie können Spontanblutungen, denen kein auslösendes Ereignis vorangeht, nicht vollständig verhindert werden. 85 Prozent der Blutungen bei schwerer Hämophilie treten in synovialen Gelenken auf (ROOSENDAAL & LAFEBER, 2003), sodass intraartikuläre Blutungen die häufigste sekundäre klinische Komplikation darstellen. Als mögliche Spätfolge kann sich eine degenerative Gelenkveränderung, die sogenannte hämophile Arthropathie entwickeln. Aber auch beim nicht-hämophilen Menschen kann es beispielsweise in der Folge eines Traumas zu intraartikulären Blutungen kommen, die pathologische Veränderungen im Gelenk nach sich ziehen können.

Die mit der Gelenkdegeneration einhergehenden Bewegungseinschränkungen und Schmerzen führen zu einer Beeinträchtigung der Lebensqualität und stellen die häufigste klinische Morbiditätsursache bei Hämophilie dar. Neben diesen chronischen, durch degenerative Gelenkveränderungen hervorgerufenen Schmerzen, sind im Leben eines Hämophilen auch akute Schmerzen, wie sie im Rahmen einer akuten intraartikulären Blutung auftreten, nicht zu vernachlässigen.

Trotz dieser beträchtlichen Bedeutung von Gelenkschmerzen wurde diesem Aspekt bisher wenig Aufmerksamkeit zuteil und es existiert kein *in vivo*-Modell, das den Schmerz bei hämophiler Arthropathie abbildet. Tiermodelle sind bisher lediglich zu dem Zweck etabliert worden, entzündliche und degenerative Gelenkveränderungen zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher - ausgehend vom etablierten Modell der autologen intraartikulären Blut-Injektion an der Ratte (NIIBAYASHI et al., 1995) - ein Tiermodell für den Gelenkschmerz bei Hämophilie etabliert werden. Dieses Versuchsvorhaben wurde durch die International Association for The Study of Pain (IASP) finanziell gefördert.

Ein derartiges präklinisches Modell könnte in der Folge die Erprobung neuer Ansätze sowohl zur Schmerzbehandlung als auch für metaphylaktische Maßnahmen bei Gelenkblutungen ermöglichen. Diesem Aspekt kommt eine große Bedeutung zu, da der Einsatz klassischer nicht-steroidaler Antiphlogistika im Rahmen der Analgesie beim Hämophilen aufgrund einer möglichen Störung der primären Hämostase limitiert ist (DALY & SCOTT, 1984; CAGNONI & ALEDORT, 1994).

Darüber hinaus könnten auch neue Erkenntnisse zur Pathogenese der hämophilen Arthropathie, die bisher zu einem großen Teil auf *in vitro*-Erkenntnissen beruht, abgeleitet werden.

## 2 SCHRIFTTUM ZUR HÄMOPHILIE

### 2.1 Ätiologie und klinische Aspekte

Erste schriftliche Erwähnung fand die auch als „Bluterkrankheit“ bezeichnete Erkrankung bereits im zweiten Jahrhundert nach Christus im Zusammenhang mit familiär gehäuften Komplikationen bei der Zirkumzision im Judentum (HÄMOPHILIEZENTRUM, 2011). Die Bezeichnung „Hämophilie“ (altgriechisch αἷμα *haima* „Blut“, griechisch φίλος *philos* „Freund“) (WIKIPEDIA, 2011) wurde durch Hopff (1828) in dessen Dissertation „Über die Hämophilie oder die erbliche Anlage zu tödlichen Blutungen“ eingeführt (HÄMOPHILIEGESELLSCHAFT, 2011).

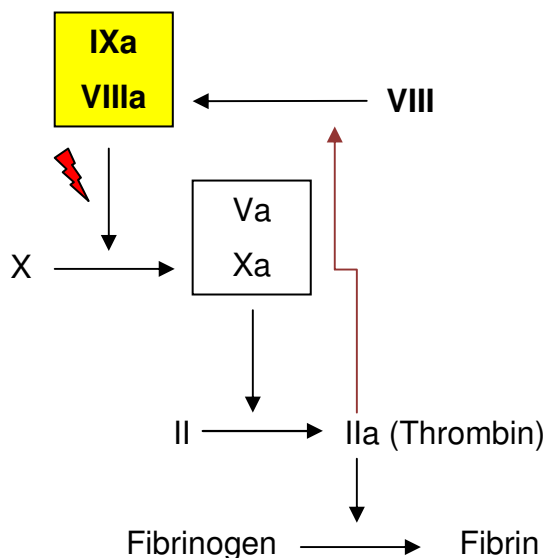
Bei der Hämophilie handelt es sich um eine X-chromosomal rezessive, hereditäre Koagulopathie, die sich fast ausschließlich bei Männern klinisch manifestiert. Man unterscheidet die häufiger auftretende Hämophilie A, der ein Defekt im Faktor VIII-Gen zugrunde liegt, und die seltenere Hämophilie B mit einem Defekt des Faktor IX-Gens (KEMKES-MATTHES & OEHLER, 2001; PABINGER-FASCHING & HARTL, 2004; LECHNER & PABINGER-FASCHING, 2007; JANSEN et al., 2008b). Die Hämophilie A wird daher auch als „klassische Hämophilie“ bezeichnet (PABINGER-FASCHING & HARTL, 2004).

Die Angaben in der Literatur bezüglich der Prävalenz der Hämophilie A in der männlichen Bevölkerung schwanken zwischen 1:5.000 (MANNHALTER, 2004) und 1:10.000 (ROOSENDAAL & LAFEBER, 2003; LECHNER & PABINGER-FASCHING, 2007). Für die Hämophilie B wird ein Auftreten bei 1 von 50.000 (MANNHALTER, 2004; LECHNER & PABINGER-FASCHING, 2007) bzw. 1 von 25.000 Männern angenommen (ROOSENDAAL & LAFEBER, 2003). Die Gesamtzahl betroffener Menschen weltweit beruht auf Schätzungen, die von etwa 400.000 (JANSEN et al., 2008b) bzw. 650.000 (HOOTS et al., 2007) betroffenen Individuen ausgehen.

Im Blut zirkuliert Faktor VIII, der auch als Antihämophiles Globulin A bezeichnet wird, an den von-Willebrand-Faktor gebunden (Trägerprotein, Faktor VIII-assoziiertes Antigen, VIII:Ag) und wird unter Thrombin-einwirkung von diesem getrennt. Im Zuge der Hämophilie wird daher oft von einer verminderten Faktor VIII:C-Aktivität (C für

Faktor VIII-clotting-activity) gesprochen, um sie von dem von-Willebrand-Jürgens-Syndrom, einer eigenständigen hereditären primären Kaogulopathie abzugrenzen (UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM, 2011).

Faktor VIIIa (Hämophilie A), ein Dimer, spielt eine wichtige Rolle in der Gerinnungskaskade, indem er als Protease wirkt. Abbildung 2.1 zeigt, dass er zusammen mit dem membrangebundenen Glykoprotein IXa (Hämophilie B) einen Enzymkomplex bildet. Ohne den als Cofaktor wirkenden Faktor IXa, der die Bindung an die Zellmembran vermittelt und die Proteaseaktivität bis zum 1000-fachen erhöht, ist Faktor VIIIa praktisch wirkungslos. Der vollständige Enzymkomplex spaltet den Faktor X zum aktiven Xa. Faktor Xa wirkt seinerseits zusammen mit dem Cofaktor Va als Prothrombinaktivator und aktiviert Faktor II (Prothrombin) zu IIa (Thrombin). Thrombin wiederum ist die wichtigste Protease der Gerinnungskaskade und bewirkt insbesondere die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen (GÖBEL & KASPERS, 2005).



**Abbildung 2.1:** Vereinfachter Ausschnitt aus der Gerinnungskaskade zur Veranschaulichung der Rolle von Faktor VIII (Hämophilie A) und Faktor IX (Hämophilie B)

Da sowohl bei der Hämophilie A als auch bei der Hämophilie B die Aktivierung des Faktors X gestört ist, handelt es sich in beiden Fällen um eine sekundäre Hämostasestörung. Beide Formen unterscheiden sich folglich nicht in ihrer klinischen Manifestation.

Heterozygote Frauen (Töchter eines Hämophilen) können die Hämophilie an ihre Nachkommen weitervererben (Konduktorinnen). Sie weisen eine durchschnittliche Faktorenaktivität von 50% auf und sind somit in der Regel symptomfrei. Allerdings kann durch die zufällige Inaktivierung eines X-Chromosoms entsprechend der Lyon-Hypothese (LYON, 1961) die Aktivität zwischen sehr niedrigen bis hin zu normalen Werten schwanken. Dementsprechend kann es in Einzelfällen auch zu einer erhöhten Blutungsneigung kommen. Des Weiteren gibt es sehr selten auch echte weibliche Bluter (homozygot), die aus der Verbindung eines Bluters und einer Konduktorin hervorgehen können (LECHNER & PABINGER-FASCHING, 2007).

Nach der Definition des wissenschaftlichen Komitees zur Standardisierung der International Society on Thrombosis and Haemostasis wird die Hämophilie in drei Schweregrade unterteilt (s. Tabelle 2.1). Die Einstufung erfolgt dabei anhand der im Plasma messbaren Gerinnungsfaktor-Aktivität bezogen auf den physiologischen Normwert. Diese korreliert in der Regel mit der klinischen Manifestation (WHITE et al., 2001). In der deutschsprachigen Fachliteratur wird die leichte Form weiter in die leichte Hämophilie (Aktivität 6-15%) und die sogenannte Subhämophilie (Aktivität 16-50%) untergliedert (KEMKES-MATTHES & OEHLER, 2001; PABINGER-FASCHING & HARTL, 2004; LECHNER & PABINGER-FASCHING, 2007).

**Tabelle 2.1:** Schweregrade der Hämophilie A und B anhand der im Plasma messbaren Aktivität der Gerinnungsfaktoren VIII bzw. IX (WHITE et al., 2001)

Schweregrade Hämophilie A/B	Restaktivität Faktor VIII/IX (in Prozent des Normalwerts)
<b>Schwere Hämophilie</b>	<1%
<b>Mittelschwere Hämophilie</b>	1 - 5%
<b>Leichte Hämophilie</b>	>5 - <40%

Das klinische Bild der Hämophilie ist auch von Gelenkeinblutungen geprägt, die insbesondere bei der schweren und mittelschweren Form (s. Tabelle 2.1) auftreten, und zwar ohne dass eine Trauma-Ätiologie zugrunde liegt. Typischerweise erfolgen diese Einblutungen in das Knie-, Ellenbogen- oder Sprunggelenk, seltener auch in das Schultergelenk. In der Folge treten Schmerzen, Entzündungszeichen

(Schwellung, Wärme, Rötung) und Bewegungseinschränkungen auf. Als Spätfolge kann sich eine degenerative Gelenkerkrankung, die sogenannte hämophile Arthropathie entwickeln, auf die in Abschnitt 2.2 genauer eingegangen wird (ARNOLD & HILGARTNER, 1977; RODRIGUEZ-MERCHAN, 1999; PABINGER-FASCHING, 2004; LECHNER & PABINGER-FASCHING, 2007).

Aufgrund der generalisierten Blutungsneigung kann es zudem zu Blutungen (zum Teil mit Hämatombildung) an verschiedensten Lokalisationen, wie intramuskulär (zweithäufigste Lokalisation nach intraartikulär), gastrointestinal, intrakraniell oder subkutan kommen (PABINGER-FASCHING, 2004; LECHNER & PABINGER-FASCHING, 2007).

Patienten mit leichter Hämophilie (s. Tabelle 2.1) haben in der Regel keine oder nur eine geringe Neigung zu Spontanblutungen (LECHNER & PABINGER-FASCHING, 2007).

Die Therapie der Hämophilie besteht aus einer Substitution, bei welcher der fehlende Faktor entweder prophylaktisch (dauerhafte Behandlung) oder im Falle einer Blutung zugeführt wird (sogenannte *on demand*-Behandlung bzw. Bedarfstherapie). Die prophylaktische Therapie erfordert eine mehrmals wöchentliche intravenöse Verabreichung des aus humanem Plasma aufgereinigten oder gentechnologisch aus tierischen Zelllinien gewonnenen Konzentrates (PABINGER-FASCHING et al., 2004). Daher wird dieses aufwendige Verfahren in erster Linie bei Kindern zur Vermeidung von Folgeschäden wie der hämophilen Arthropathie oder bei besonderen Indikationen durchgeführt. In der Regel wird die Bedarfstherapie angewendet, bei der beim Auftreten von Blutungen nach Bedarf substituiert wird (LECHNER & PABINGER-FASCHING, 2007).

Eine Übertragung infektiösen Materials bei Konzentraten humanen Ursprungs, wie in den 80er und 90er Jahren des letzten Jahrhunderts für HI (Humane Immundefizienz)- und Hepatitis C-Viren aufgetreten, kann durch moderne Verfahren der Konzentratherstellung heutzutage nahezu ausgeschlossen werden (PABINGER-FASCHING et al., 2004; JANSEN et al., 2008b). Dennoch treten bei der Substitutionstherapie nach wie vor klinisch manifeste Komplikationen auf. So kommt es beispielsweise bei 25 bis 30% der Patienten mit schwerer Hämophilie zur Bildung von Antikörpern gegen die Gerinnungsfaktoren (SCHARRER et al., 1999), was nicht nur den Therapieerfolg mindert.



Bei leichter Hämophilie A ist zum Teil auch der Einsatz von Desmopressin (Desamino-D-Arginin-Vasopressin) möglich. Dabei handelt es sich um ein synthetisches Vasopressin-Analogon, das zur Freisetzung des von-Willebrand-Faktors aus den Endothelzellen und gleichzeitig auch zu einem Anstieg des Gerinnungsfaktors VIII im Blut führt (PABINGER-FASCHING et al., 2004).

Lebensbedrohliche Komplikationen können mit der heute gängigen Substitution weitgehend vermieden werden. Dies gilt aber nicht für Blutungen an sich, die zu chronischen Schäden führen können, insbesondere an den am häufigsten betroffenen Gelenken (WATZKE, 2004; ROOSENDAAL & LAFEBER, 2007).

## 2.2 Vorkommen beim Tier

Bei der Hämophilie A handelt es sich um die häufigste hereditäre Hämostasestörung des Haustieres (MANSELL, 2000), die Hämophilie B wird deutlich seltener gesehen, wobei die genaue Prävalenz der Hämophilie A und B beim Tier nicht bekannt ist (MISCHKE, 2003).

Hämophilie A tritt bei Hund, Katze und Pferd auf (JAIN, 1993; AIRD, 2000; FRY & MCGAVIN, 2009). Es gibt zudem Berichte vom Vorkommen bei Schweinen (AIRD, 2000) und bei Rindern (FRY & MCGAVIN, 2009). Fälle von Hämophilie B sind nur bei Hund und Katze bekannt (JAIN, 1993; AIRD, 2000; FRY & MCGAVIN, 2009). Beim Pferd ist die Hämophilie zwar selten, dennoch stellt sie bei dieser Spezies die am häufigsten auftretende Koagulopathie überhaupt dar (FEY, 2006) und zeigt in der Regel schwere Verläufe mit geringen Überlebenschancen (ARCHER & ALLEN, 1972).

Die meisten Fallberichte finden sich für den Hund. Auch beim Hund ist die Hämophilie die häufigste hereditäre Koagulopathie (BROOKS, 1999), wobei die Hämophilie A in der Mehrzahl der Fälle auftritt (DODDS, 1983). Weltweit wurden Fälle bei vielen verschiedenen Hunderassen beschrieben. In Deutschland wurde bisher die Hämophilie A beim Deutschen Schäferhund (am häufigsten betroffen), Siberian Husky, Dackel und Malteser, die Hämophilie B beim Rhodesian Ridgeback, Deutsch Drahthaar und Bernhardiner beschrieben (MISCHKE, 2003). Bei der Katze tritt die Hämophilie gehäuft bei Europäisch und Britisch Kurzhaar-Katzen auf (COUTO, 2006).

Bei den Haussäugetieren wird die Hämophilie ebenfalls X-chromosomal rezessiv vererbt und manifestiert sich daher in erster Linie bei männlichen Individuen. Weibliche Tiere fungieren, wie in Abschnitt 2.1 für den Menschen beschrieben, in erster Linie als Konduktorinnen. Bezüglich deren Blutungsneigung gilt das für den Menschen Beschriebene analog (s. ebd.) (JAIN, 1993; MANSELL, 2000; MISCHKE, 2003; ABRAMS-OGG, 2009; FRY & MCGAVIN, 2009). Auch in der Tiermedizin sind sehr seltene Fälle von echten weiblichen Blutern beschrieben (BRINKHOUS & GRAHAM, 1950; MURTAUGH & DODDS, 1988).

Klinisch manifestiert sich die Hämophilie beim Haussäugetier sehr ähnlich wie beim Menschen.

So werden ebenfalls Blutungen in Muskulatur und Gelenke beobachtet, die sich in wechselnden Lahmheiten äußern können (FIELD et al., 1946; GRAHAM et al., 1949; SWANTON, 1959; JAIN, 1993; MISCHKE et al., 1996; MISCHKE, 2003; FEY, 2006; ABRAMS-OGG, 2009). Von intraartikulären Blutungen ist insbesondere das Kniegelenk betroffen (MISCHKE et al., 1996). Die Entwicklung einer degenerativen Arthropathie ist auch für das Tier beschrieben (MISCHKE, 2003).

Häufig treten große Hämatome auf und Komplikationen im Rahmen operativer Eingriffe oder nach Traumen sind nicht selten. Auch Schleimhautblutungen wie zum Beispiel im Urogenital- oder Gastrointestinaltrakt treten auf. Im Rahmen des Zahnwechsels sind zudem oftmals langanhaltende Blutungen auffällig (FIELD et al., 1946; GRAHAM et al., 1949; SWANTON, 1959; JAIN, 1993; MISCHKE et al., 1996; MISCHKE, 2003; COUTO, 2006; FEY, 2006; ABRAMS-OGG, 2009).

Schwerste Mängel an Gerinnungsfaktoren sind in der Regel nicht mit dem Leben vereinbar, sodass diese Tiere nur selten die Geschlechtsreife erreichen (MISCHKE, 2003).

Die Therapie der Hämophilie hat nahezu ausschließlich in der Kleintiermedizin Eingang gefunden. Im Falle einer Blutungskrise kann durch Plasmafraktionierung gewonnenes Kryopräzipitat (enthält Faktor VIII in hoher Konzentration zur Therapie bei Hämophilie A) oder Frisch- bzw. frischgefrorenes Plasma transfundiert werden. Der Einsatz heterologer Einzelfaktorkonzentrate humanen oder auch porcinen Ursprungs ist ebenfalls möglich, aber mit hohen Kosten und dem Risiko einer Antikörperbildung verbunden (JAIN, 1993; MANSELL, 2000; MISCHKE, 2003). Desmopressin könnte bei Tieren mit Hämophilie A ebenfalls eingesetzt werden (s. Abschnitt 2.1), über die Effektivität beim Tier existieren allerdings keine gesicherten Erkenntnisse (JAIN, 1993; MANSELL, 2000; ABRAMS-OGG, 2009). Ein Anstieg der VIII:C-Aktivität konnte beispielsweise beim Hund nicht festgestellt werden (MISCHKE et al., 1996).

## 2.3 Pathophysiologie der Blut-induzierten Arthropathie

Aufgrund der heute bei Hämophilie üblichen Substitutionstherapie ist die Lebenserwartung betroffener Menschen stark angestiegen. Doch damit nimmt auch die Gesamtzahl an Gelenkblutungen im Leben eines Hämophilen zu, da es trotz moderner Therapiemöglichkeiten immer noch zu Blutungen kommen kann (JANSEN et al., 2008b) und allgemein 85% dieser Blutungsereignisse auf die Gelenke entfallen (ROOSENDAAL & LAFEBER, 2003). Selbst bei anhaltend praktizierter Prophylaxe, die mit dem hohem Aufwand einer mehrmaligen wöchentlichen intravenösen Applikation verbunden ist, treten im Schnitt noch zwei bis drei Blutungen pro Jahr auf (VAN DIJK et al., 2005). Es gibt zudem Schätzungen, dass 75% der Patienten weltweit keine optimale Therapie erhalten (ROOSENDAAL & LAFEBER, 2007) und sich nur 20% eine Bedarfstherapie leisten können (RODRIGUEZ-MERCHAN, 1999). So liegen die durchschnittlichen Kosten einer derartigen anhaltenden Prophylaxe beim Kind in den USA bei 300.000 US-Dollar pro Jahr (MANCO-JOHNSON et al., 2007). Ein Kind, das nicht ständig prophylaktisch substituiert wird, erleidet im Jahr durchschnittlich 30 bis 35 Gelenkblutungen (MANCO-JOHNSON et al., 1994).

Des Weiteren wurde auch von subklinischen Blutungen berichtet, die zu radiologisch und Magnetresonanz-tomographisch sichtbaren degenerativen Veränderungen führen können (MANCO-JOHNSON et al., 2007). Außerdem kann es als Therapiekomplication zur Bildung von Antikörpern gegen die zugeführten Gerinnungsfaktoren kommen. Da dann sowohl die Prophylaxe als auch die Behandlung einer akuten Gelenkblutung erschwert ist, entwickeln diese Patienten auch häufiger pathologische Gelenkveränderungen (SOUCIE et al., 2004).

Wiederholte intraartikuläre Blutungen mit der Spätfolge einer Gelenkdestruktion, der sogenannten hämophilen Arthropathie, stellen daher die häufigste sekundäre klinische Komplikation dar und beeinträchtigen die Patienten am stärksten (RAFFINI & MANNO, 2007).

### 2.3.1 Aktuelles Konzept der Pathogenese

Die im Zuge der Hämophilie auftretende degenerative Gelenkveränderung wird als „hämophile Arthropathie“ (HA) bezeichnet. Hingegen kann eine „Blut-induzierte Arthropathie“ (BIA) auch durch ein Gelenktrauma, wie beispielsweise eine intraartikuläre Fraktur oder eine Bandruptur, hervorgerufen werden (JANSEN et al., 2008b). Auch bei experimentellen Untersuchungen zum Effekt von intraartikulär injiziertem Blut spricht man von einer BIA.

Bei der HA handelt es sich um eine spezielle Form der Arthrose (RODRIGUEZ-MERCHAN & RIBBANS, 1997). Sie ist gekennzeichnet durch radiologisch erkennbare Sekundärveränderungen, die infolge der Zerstörung des Gelenkknorpels auftreten. Dabei können auch subchondrale Knochenanteile mit betroffen sein (STOKER & MURRAY, 1974; RIPPEY et al., 1978; RODRIGUEZ-MERCHAN, 1998, 1999).

Die derzeitig vorliegenden Erkenntnisse über die Pathogenese der HA basieren auf einer vergleichsweise kleinen Zahl von Studien. Daher ist das Wissen über die Pathogenese-Mechanismen der HA im Vergleich zu anderen Arthropathien, wie etwa der rheumatoiden Arthritis oder der Arthrose, nicht sehr umfassend. Sicher ist, dass das Geschehen dabei multifaktoriell ist und sowohl degenerative Knorpelveränderungen als auch entzündliche Vorgänge an der Synovialmembran eine Rolle spielen (ROOSENDAAL & LAFEBER, 2006).

Lange Zeit dominierte das Konzept der Synovitis-abhängigen Knorpeldestruktion die Hämophilie-Forschung (ARNOLD & HILGARTNER, 1977; MADHOK et al., 1988; MADHOK et al., 1991). Dabei wird davon ausgegangen, dass sich aufgrund der wiederholten Blutung zunächst eine Synovitis ausbildet, in deren Folge es dann zur Knorpeldestruktion kommt.

Dass eine Synovitis zwangsläufig zur Knorpelzerstörung beiträgt und den Prozess der Gelenkdestruktion beschleunigt, ist erwiesen (MCLARDY SMITH et al., 1984; ROOSENDAAL et al., 1998). Allerdings sind auch Studien publiziert worden, die Knorpelveränderungen *in vivo* bereits vor bzw. unabhängig von der Entwicklung einer Synovitis feststellen konnten (HOAGLUND, 1967; FABRY, 1989). Aus diesen Ergebnissen ergab sich eine zweite Theorie zur Pathogenese der HA, die Synovitis-unabhängige Knorpelzerstörung, die ihrerseits dann zu einer Synovitis führt. Dieses Konzept, das dem der Entstehung der Arthrose ähnelt (BUCKWALTER & MARTIN, 1995), wird durch neuere Studien sowohl *in vitro* (ROOSENDAAL et al., 1997; ROOSENDAAL et al., 1999b; HOOIVELD et al., 2003a) als auch *in vivo* (ROOSENDAAL et al., 1999c) bestätigt. In dieser caninen *in vivo*-Studie (ROOSENDAAL et al., 1999c) konnten bereits vier Tage nach der ersten Blutexposition entzündliche Veränderungen der Synovialmembran gesehen werden. Dagegen konnten knorpelzerstörende Wirkungen der freigesetzten

Entzündungsmediatoren erst nach zwei Wochen festgestellt werden, obwohl bereits am vierten Tag Veränderungen im Knorpelstoffwechsel auftraten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass intraartikuläres Blut zum einen eine unmittelbar schädigende Wirkung auf den Gelenkknorpel hat, und zum anderen zu Veränderungen der Synovialmembran führt. Beide Prozesse laufen parallel und unabhängig voneinander ab, können sich aber gegenseitig beeinflussen (ROOSENDAAL & LAFEBER, 2006; JANSEN et al., 2008b).

### **2.3.2 Veränderungen der Synovialmembran**

Die Synovialmembran (Membrana synovialis) bildet die innere Auskleidung der Gelenkkapsel synovialer Gelenke. Neben der Bildung der Synovia hat die Membrana synovialis auch eine Reinigungsfunktion, indem sie Abbau- und Stoffwechselprodukte sowie Fremdstoffe abtransportiert (BROWN et al., 1991; GARNERO, 2006). Die Synovialmembran gliedert sich in eine dünne Deckschicht (Intima), die aus spezialisierten Makrophagen (Synoviozyten Typ A) und Fibroblasten (Synoviozyten Typ B) besteht. Darunter befindet sich eine Subintima mit Fett- und Bindegewebe, die Blut- und Lymphgefäße enthält. Die Gefäße sind sehr wahrscheinlich zusammen mit den Synoviozyten Typ A (Makrophagen) für die Beseitigung von Abbauprodukten und von Blut im Falle einer intraartikulären Blutung verantwortlich. Der genaue Mechanismus ist allerdings noch nicht geklärt (EDWARDS, 1994; TARNER et al., 2005; GARNERO, 2006). In diesem Zusammenhang sei auch darauf hingewiesen, dass es nach wie vor im Einzelnen unklar ist, wie es das Gelenk bewerkstelligt, die große Menge an Blut bei einem Hämophilen nach einer Gelenkblutung zu beseitigen (JANSEN et al., 2008b).

Eine wichtige Rolle in der Pathogenese der BIA kommt dem eisenhaltigen Hämosiderin zu, das beim Abbau des Hämoglobins aus den Erythrozyten anfällt. Aufgrund der großen Menge an Blut akkumuliert das Hämosiderin nach Phagozytose im synovialen Gewebe und wirkt verstärkend auf das entzündliche Geschehen (DABBAGH et al., 1993). Hämosiderin-Ablagerungen wurden auch im Knorpel beobachtet (HOUGH et al., 1976; STEIN & DUTHIE, 1981). Das im Hämosiderin enthaltene Eisen wirkt proliferativ auf die Synoviozyten und führt u.a. durch Apoptose-Hemmung zu einer Hyperplasie des synovialen Gewebes (ROY &

GHADIALLY, 1969; NISHIYA, 1994; WEN et al., 2002; HAKOBYAN et al., 2004; VALENTINO et al., 2004; HAKOBYAN et al., 2005).

In der Folge entwickelt sich ein Entzündungsgeschehen, das zu einer Synovitis führt (MAINARDI et al., 1978; RODRIGUEZ-MERCHAN, 1997; VALENTINO et al., 2004; RODRIGUEZ-MERCHAN, 2007; VALENTINO et al., 2007) und in einer Fibrosierung des Gewebes endet (STEIN & DUTHIE, 1981; MADHOK et al., 1991).

Im Rahmen der entzündlichen Vorgänge kommt es zu einer Hypervaskularisation der Subintima (MADHOK et al., 1991), wodurch neue Blutungen begünstigt werden. Dies trägt höchstwahrscheinlich auch zur Ausbildung von sogenannten „Target Joints“ bei, einem oft zu beobachtenden aber wissenschaftlich noch nicht geklärten Phänomen bei Hämophilen, bei dem die Betroffenen immer wieder in das gleiche Gelenk bluten (RODRIGUEZ-MERCHAN & RIBBANS, 1997; RODRIGUEZ-MERCHAN, 1999; JANSEN et al., 2008b; MEJIA-CARVAJAL et al., 2008).

Synoviales Gewebe mit Hämosiderin-Ablagerungen produziert zudem vermehrt proinflammatorische Zytokine (Interleukin (IL)-1, IL-6 und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )), denen gewebezerstörende Eigenschaften zugeschrieben werden (ROOSENDAAL et al., 1998). Außerdem konnten erhöhte Konzentrationen an proteolytischen Enzymen in Synovialmembran und Synovia nachgewiesen werden (HILGARTNER et al., 1972), die vermutlich eine destruktive Wirkung auf synoviale Strukturen und Knorpel haben.

Die im Rahmen der Synovitis ablaufenden Vorgänge konnten auch *in vivo* bereits nachvollzogen werden. Nach einer einzigen experimentell induzierten Blutung zeigte die Synovialmembran eine über zwei Wochen anhaltende Entzündungsreaktion. Nach dieser Zeit entnommene Zellen bildeten in Zellkultur einen Überstand mit knorpelschädigenden Eigenschaften (ROOSENDAAL et al., 1999c).

Blut im Gelenk führt demnach zu einer Synovitis, die durch die Produktion von gewebeschädigenden Mediatoren und Enzymen eine Knorpeldestruktion zur Folge hat (JANSEN et al., 2008b).

### **2.3.3 Veränderungen im Gelenkknorpel**

Intraartikuläres Blut hat auch Synovitis-unabhängige, direkte Effekte auf den Gelenkknorpel.

So führt eine *in vitro*-Exposition von Knorpelzellen über vier Tage - dies entspricht der vermuteten Resorptionsdauer *in vivo* - zu einer nahezu vollständigen Hemmung

der Proteoglycan-Synthese und zu einer erhöhten Freisetzung von Proteoglycanen aus der Knorpelmatrix (ROOSENDAAL et al., 1997; ROOSENDAAL et al., 1999b). Der hemmende Einfluss auf die Proteoglycan-Synthese ist dabei langanhaltend und über mindestens zehn Wochen feststellbar (HOOIVELD et al., 2003a).

Ein direkter schädigender Effekt von Blut auf Knorpel konnte auch *in vivo* nachvollzogen werden (ROOSENDAAL et al., 1999c, 2000; HOOIVELD et al., 2003a). Dabei zeigte sich zusätzlich zur *in vitro* offensichtlich gewordenen verminderten Synthese und der gleichzeitig erhöhten Freisetzung von Proteoglycan auch eine Schädigung des Kollagen-Gerüsts (CONVERY et al., 1976; ROOSENDAAL et al., 1999c).

Die *in vitro* zu beobachtenden Langzeiteffekte sind auf eine Apoptose der Chondrozyten zurückzuführen (HOOIVELD et al., 2003b). Knorpelgewebe enthält als einzigen Zelltyp Chondrozyten (MUIR, 1995; ARCHER & FRANCIS-WEST, 2003), die im menschlichen Gelenkknorpel in verhältnismäßig kleiner Anzahl im Vergleich zum relativ großen Anteil an extrazellulärer Matrix vorkommen. Chondrozyten sind für die Bildung und Erhaltung der extrazellulären Matrix, die sich vor allem aus Kollagen und Proteoglycan zusammensetzt, verantwortlich. Diese Knorpelmatrix befindet sich in einem ständigen Umbau, wobei ein empfindliches Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau besteht (NIIBAYASHI et al., 1995). Da Chondrozyten im adulten Gelenkknorpel kaum mehr proliferationsfähig sind (MUIR, 1995), führt ein Absterben von Chondrozyten zu einer langanhaltenden Beeinträchtigung des Knorpelstoffwechsels (BURKHARDT et al., 1986). Für die Apoptose-Induktion spielt wiederum aus Erythrozyten stammendes Eisen eine wichtige Rolle. Eisen wirkt katalytisch auf die Bildung von sauerstoffhaltigen, negativ geladenen Ionen (MORRIS et al., 1995; WINTERBOURN, 1995; HENLE & LINN, 1997) aus von Chondrozyten gebildetem Wasserstoffperoxid (TIKU et al., 1990).

Die pathogenetische Bedeutung dieses Eisen-katalysierten oxidativen Stresses konnte durch *in vitro*-Studien mit Radikalfängern bestätigt werden. In deren Gegenwart kam es zu einer weniger starken Verminderung der Proteoglycan-Synthese (ROOSENDAAL et al., 1999b; HOOIVELD et al., 2003c). Gleichzeitig konnte auch gezeigt werden, dass Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), das die Bildung von Wasserstoffperoxid durch die Chondrozyten stimuliert, in Verbindung mit Erythrozyten zu einer langanhaltenden Hemmung der Proteoglycan-Synthese führt (HOOIVELD et al., 2003c). Letztere konnte durch Erythrozyten alleine nicht



hervorgerufen werden. Aktivierten Monozyten bzw. Makrophagen aus intraartikulärem Blut, die neben anderen inflammatorischen Zytokinen IL-1 $\beta$  freisetzen (JANSEN et al., 2008b), wird daher in Verbindung mit Erythrozyten eine wichtige Rolle im Apoptoseprozess der Chondrozyten zugeschrieben.

Intraartikuläres Blut hat somit eine direkte, Synovitis-unabhängige schädigende Wirkung auf den Gelenkknorpel. Diese Effekte tragen vermutlich zusätzlich zu den durch Hämosiderin ausgelösten entzündlichen Veränderungen zur Entstehung der hämophilen Synovitis bei (ROOSENDAAL & LAFEBER, 2006).

## 2.4 Schmerz und Hämophilie

Laut der Definition der International Association for the Study of Pain (IASP) handelt es sich bei Schmerz um ein „unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit aktueller oder potentieller Gewebeschädigung verknüpft ist oder mit Begriffen einer solchen Schädigung umschrieben wird“ (IASP, 1978). Aus dieser Definition wird deutlich, dass Schmerz immer eine subjektive Komponente aufweist.

Beim Tier ist bereits das Erkennen von Schmerzen durch den Menschen beeinflusst, da es auf der subjektiven Interpretation von Verhaltensänderungen, die dem Schmerz zugeschrieben werden, beruht (HENKE et al., 1999).

Im Leben eines Hämophilen kommen Gelenkschmerzen sowohl akut bei einer intraartikulären Blutung als auch chronisch bei HA vor. Eine Humanstudie ergab, dass mehr als die Hälfte der Befragten täglich und 78% mindestens einmal pro Woche unter Gelenkschmerzen leiden, (ELANDER et al., 2009). Anders als bei anderen degenerativen Arthropathien sind Menschen mit Hämophilie bereits frühzeitig mit Schmerz konfrontiert. So haben selbst Hämophile, die eine ständige prophylaktische Substitution erhalten, in der Regel bereits im Kindesalter Erfahrung mit schmerzhaften Gelenken machen müssen (SPITZER, 1993).

### 2.4.1 Neuronale Grundlagen des Gelenkschmerzes

Untersuchungen zum Gelenkschmerz bei Hämophilie beschränken sich in erster Linie auf Fragebogen-gestützte Befragungen von Patienten, um die Lebensqualität und den Umgang mit Schmerz beurteilen zu können (CHOINIÈRE & MELZACK, 1987; ELANDER et al., 2009). Erkenntnisse zur Pathogenese von Gelenkschmerz stammen vor allem aus Untersuchungen zu entzündlichen Arthropathien, da verschiedene Tiermodelle zu deren Erforschung etabliert sind. Die Pathogenese Arthrose-assoziiertes Schmerzes ist dagegen noch weitgehend unklar (SCHAIBLE et al., 2009). Vermutlich spielen entzündliche Veränderungen der artikulären Strukturen eine Rolle (FELSON, 2005; SCOTT, 2006). Im fortgeschrittenen Stadium tragen möglicherweise eine Fibrosierung der Gelenkkapsel und Muskelkontrakturen zur Schmerzentstehung bei (SCOTT, 2006). Ähnliche Veränderungen treten auch bei der HA auf, die nach heutiger Vorstellung eine spezielle Form der Arthrose darstellt (RODRIGUEZ-MERCHAN & RIBBANS, 1997).

Das Gelenk wird mittels dreier verschiedener Neuronen, den A $\beta$ -, den A $\delta$  und den C-Fasern, sensibel innerviert. Freie Nervenendigungen kommen mit Ausnahme von

gesundem Knorpel in allen Gelenkanteilen vor (SCHAIBLE et al., 2009). Während A $\beta$ -Fasern durch nicht-noxische Stimuli erregbar sind (DORN et al., 1991), fungieren A $\delta$ - und C-Fasern als Nozizeptoren. Nozizeptoren sind durch verschiedenartige hochschwellige Reize, wie mechanische, thermische, chemische oder elektrische Stimuli aktivierbar und werden daher als polymodal bezeichnet (MESSLINGER, 1997). Daneben existieren sogenannte initial mechanoinsensitive (stumme) Nozizeptoren, die sich vor allem aus C-Fasern zusammensetzen (SCHAIBLE & SCHMIDT, 1983a, 1983b). Nozizeptoren werden durch Gewebeschädigung bzw. inflammatorische Prozesse sensibilisiert (periphere Sensibilisierung), wodurch die neuronale Erregungsschwelle sinkt und die sogenannten „stummen“ Nozizeptoren überhaupt erst erregbar werden (GRIGG et al., 1986; SCHAIBLE & GRUBB, 1993). Eine derartige Sensibilisierung ist auch im Rahmen einer HA wahrscheinlich, da es dabei ebenfalls zu entzündlichen Veränderungen mit Freisetzung von Entzündungsmediatoren kommt (s. 2.3.2).

Die nozizeptiven Afferenzen aktivieren im Rückenmark sensorische Neurone des Hinterhorns der grauen Substanz. Diese Hinterhorn-Neurone aktivieren über aufsteigende Bahnen das thalamocorticale System (TREEDE et al., 1999; VOGT, 2005). In dessen lateralem Anteil wird der noxische Reiz analysiert (Lokalisation, Dauer, Intensität), im medialen Anteil wird die affektive Komponente des Schmerzes generiert. Daraus gehen die aversiven Reaktionen, die im Rahmen noxischer Reize auftreten, hervor (TREEDE et al., 1999; SCHAIBLE & RICHTER, 2004). Die Schmerzverarbeitung im Rückenmark wird von absteigenden Bahnen beeinflusst, die hemmend oder fördernd auf die Nozizeption einwirken. Diese haben ihren Ursprung im Hirnstamm und verlaufen im dorsolateralen Funiculus des Rückenmarks (MILLAN, 2002). In Verbindung mit segmentalen inhibitorischen Neuronen ermöglichen diese Bahnen eine endogene Kontrolle der Verarbeitung noxischer Reize.

#### **2.4.2 Periphere und zentrale Sensibilisierung**

Unter physiologischen Bedingungen wird das nozizeptive System nur durch noxische Reize erregt. Im Rahmen einer Entzündung kommt es zu einer Sensibilisierung (BENNETT, 2000), die zu Allodynie und Hyperalgesie führt. Bei der Allodynie kommt es zum Absenken der Schmerzschwelle, sodass normalerweise nicht-noxische Reize als schmerzhaft empfunden werden. Unter Hyperalgesie versteht man ein

verstärktes Schmerzempfinden auf bereits physiologischerweise schmerzhaft wahrgenommene Reize (HENKE & ERHARDT, 2004).

Neben einer gesteigerten Erregbarkeit polymodaler Nozizeptoren (PERL et al., 1976; CAMPBELL & MEYER, 1983) werden im Zuge einer Sensibilisierung auch die initial mechanoinsensitiven (stummen) Nozizeptoren rekrutiert, die dadurch durch mechanische und thermische Reize erregbar werden. Dies hat zur Folge, dass im zentralen Nervensystem verstärkt nozizeptive Erregungen verarbeitet werden (SCHAIBLE, 2006).

Nozizeptoren haben daneben auch efferente Funktionen und führen durch Freisetzung von Mediatoren zu einer neuronalen Entzündung (SCHAIBLE & GRUBB, 1993; KOBAYASHI et al., 2005).

Diese Vorgänge werden als periphere Sensibilisierung bezeichnet, da sie am peripheren ersten Neuron der Schmerzbahn stattfinden und zu einem veränderten afferenten Eingang ins Rückenmark führen.

Daneben kommt es auch zu einer zentralen Sensibilisierung, die zu einer erhöhten Erregbarkeit der nozizeptiven Neurone im Rückenmark führt (DOUGHERTY & WILLIS, 1992; LAMOTTE et al., 1992; TOREBJORK et al., 1992). Die sensibilisierten Neurone reagieren verstärkt auf die Reizung des entzündeten oder verletzten Areals (primäre Hyperalgesie), aber auch der benachbarten, gesunden Region (sekundäre Hyperalgesie). Zudem kommt es zu einer Vergrößerung der rezeptiven Felder in der Peripherie, von denen aus eine Aktivierung des Neurons im Rückenmark möglich ist (WOOLF, 1983; SCHAIBLE et al., 2005).

Im Falle dieser Sensibilisierung kann das Rückenmark nicht nur von A $\delta$ - und C-Fasern nozizeptiv erregt werden, sondern auch von A $\beta$ -Fasern (WOOLF, 1983). Dies trägt vermutlich zu einem weiteren Effekt, der Allodynie bei (siehe oben).

## 2.5 Etablierte Tiermodelle

Tiermodelle haben maßgeblich zur Erforschung der Pathophysiologie der humanen Hämophilie beigetragen. Zudem ermöglichten diese Modelle die Entwicklung neuer Therapieoptionen und werden für diesen Zweck auch weiterhin vonnöten sein (OVLISEN et al., 2008).

Für die Zulassung neuer Medikamente sind Tierversuche außerdem gesetzlich vorgeschrieben.

Viele Fortschritte in der Therapie der Hämophilie beruhen auf Erkenntnissen, die an Hunden mit Hämophilie gewonnen werden konnten und die somit einem tierischen *in vivo*-Modell entstammen.

1946 wurde die Hämophilie beim Hund erstmals genauer untersucht (FIELD et al., 1946). Ein Jahr später wurde an der Universität von North Carolina (Chapel Hill) aus einem Irish Setter-Rüden mit schwerer Hämophilie A die sogenannte Chapel Hill Hämophilie A-Hundekolonie gegründet (GRAHAM et al., 1949), von deren Existenz die Hämophilie-Forschung bis heute profitiert (BRINKHOUS & GRAHAM, 1950; BRINKHOUS et al., 1973; LOZIER et al., 2002). In Folgearbeiten wurde an Hunden mit Hämophilie A, die dieser Kolonie entstammten, unter anderem die aktivierte partielle Thromboplastin-Zeit (aPTT), ein in Human- und Tiermedizin routinemäßig genutzter Gerinnungsparameter, etabliert (LANGDELL et al., 1953).

Obwohl dieses Hunde-Modell den Vorteil bietet, dass es in seinem pathologischen Phänotyp dem hämophilen Menschen sehr ähnlich ist, haben dessen limitierte Verfügbarkeit sowie die hohen Kosten die Entwicklung von Kleinsäuger-Modellen vorangetrieben. So wurden beispielsweise Kaninchen- und Maus-Modelle entwickelt, in denen durch Verabreichung von Antikörpern oder anderen Inhibitoren vorübergehend Hämophilie-ähnliche Zustände herbeigeführt werden können (SHEN et al., 1973; O'BRIEN et al., 1988; ERHARDTSEN et al., 1995; TOMOKIYO et al., 2001; TRANHOLM et al., 2003). Daneben wurde insbesondere in den letzten 15 Jahren eine große Anzahl von gentechnologisch veränderten Mäusestämmen geschaffen, bei denen das Faktor VIII- bzw. IX-Gen manipuliert wurde (BI et al., 1995; BI et al., 1996; LIN et al., 1997; WANG et al., 1997; KUNDU et al., 1998; MUCHITSCH et al., 1999; JIN et al., 2004).

Allerdings zeigen diese Tiere nur vereinzelt spontane Blutungen in typischer Lokalisation wie dem Gelenk und werden daher, wie die Inhibitor-Modelle, in erster

Linie als Blutungsmodelle für pharmakologische Untersuchungen oder für die Erprobung gentherapeutischer Ansätze eingesetzt (OVLISEN et al., 2008).

Seit sich bei Hämophilie die Behandlung mit Faktor-Konzentraten durchgesetzt hat und dadurch lebensbedrohliche Komplikationen selten geworden sind, rücken zunehmend die sekundären Komplikationen der Hämophilie in den Fokus der Forschung. Die häufigste klinische Komplikation stellen dabei, wie oben erläutert, spontane intraartikuläre Blutungen (ROOSENDAAL & LAFEBER, 2003) dar, mit dem Risiko der Entwicklung einer HA. Für diesen Krankheitskomplex sind bislang nur wenige Tiermodelle etabliert.

Die häufigste Erwähnung in der Literatur findet dabei das canine *in vivo*-Modell (ROOSENDAAL et al., 1999c; ROOSENDAAL et al., 1999a; ROOSENDAAL et al., 2000; HOOIVELD et al., 2003a; HOOIVELD et al., 2004). Daneben finden sich Beschreibungen weiterer *in vivo*-Versuche an Hunden (HOAGLUND, 1967; CONVERY et al., 1976; MADHOK et al., 1988) sowie an Kaninchen (WOLF & MANKIN, 1965; ROY & GHADIALLY, 1966, 1969) und auch an Ratten (NIIBAYASHI et al., 1995). Allen diesen Modellen ist gemein, dass genetisch intakte, gesunde Tiere verwendet werden, an denen die Gelenkblutung mittels intraartikulärer Blut-Injektion, zum Beispiel ins Kniegelenk, simuliert wird.

Neuerdings wird auch ein Faktor VIII-defizientes murines *in vivo*-Modell (BI et al., 1995; BI et al., 1996) zur Untersuchung der im Rahmen einer Gelenkblutung auftretenden Synovitis eingesetzt (VALENTINO et al., 2004; HAKOBYAN et al., 2005; MEJIA-CARVAJAL et al., 2008). Das Problem an diesem Modell ist, dass es nicht zu spontanen Blutungen kommt (BI et al., 1996), sodass die intraartikuläre Blutung durch ein stumpfes Trauma auf das Kniegelenk ausgelöst werden muss (VALENTINO et al., 2004; MEJIA-CARVAJAL et al., 2008). Dieses Modell entspricht daher zwar von der Genese her gesehen der Hämophilie beim Menschen. Das erforderliche Gelenktrauma hat jedoch keinen Bezug zur Pathophysiologie der spontan auftretenden Gelenkblutung beim hämophilen Menschen.

An all den oben genannten Tiermodellen ist gemeinsam, dass sie ausschließlich zur Untersuchung entzündlicher oder degenerativer Gelenkveränderungen genutzt wurden. Lediglich das Faktor VIII-defiziente Mausmodell wurde darüber hinaus auch auf motorische Einschränkungen untersucht (MEJIA-CARVAJAL et al., 2008). Zur Erfassung der Schmerzen, die im Rahmen einer HA auftreten und die eine bedeutende Rolle im Leben eines Hämophilen spielen (ELANDER et al., 2009), wurden die etablierten *in vivo*-Modelle bisher nicht verwendet.

## 2.6 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Effekt von intraartikulärem Blut auf das schmerz-assoziierte Verhalten untersucht werden, mit dem Ziel, ein experimentell nutzbares Tiermodell für den Schmerz bei der hämophilen Arthropathie (HA) zu etablieren.

Hierfür wurde durch die intraartikuläre Blut-Injektion ins Kniegelenk der Ratte eine Arthropathie (BIA) ausgelöst. Dieser Ansatz beruht teilweise auf dem an der Ratte bereits etablierten Modell der einmaligen autologen Vollblut-Injektion zur Untersuchung von degenerativen Knorpelveränderungen (NIIBAYASHI et al., 1995).

Die im Rahmen dieser Dissertation beabsichtigten Versuche sollten zur Klärung folgender Fragen beitragen:

- Ruft die intraartikuläre Injektion von autologem Vollblut ein schmerz-assoziiertes spezifisches Verhalten bei Ratten hervor, das der klinischen Manifestation einer Arthropathie beim Hämophilen ähnelt?
- Wie ist dabei der Zeitverlauf der schmerz-assoziierten Veränderungen bei BIA oder HA, auch im Vergleich zu einem einmaligen Blutungsereignis?
- Welchen Effekt hat die Injektion einzelner Blutbestandteile verglichen mit der von Vollblut?

Zur Klärung dieser Fragen sollte ein experimentell nutzbares Modell für den Gelenkschmerz bei Menschen mit Hämophilie etabliert und validiert werden, das schließlich auch der Erprobung neuer Therapieoptionen dienen könnte. Zu erwarten war auch, dass die dabei gewonnenen Erkenntnisse einen Beitrag zur weiteren Aufklärung der Pathogenese der HA liefern, da die bisherigen Erkenntnisse hierzu hauptsächlich auf *in vitro*-Ergebnissen beruhen.



### **3 MATERIAL UND METHODEN**

#### **3.1 Versuchstiere**

Für die Versuche im Rahmen dieser Arbeit wurden 59 weibliche Inzuchtratten vom Stamm „Lewis“ verwendet. Die Tiere wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld) im Alter von 6 bis 8 Wochen mit einem Ausgangskörpergewicht von 160 bis 180 Gramm bezogen.

Der Tierversuchsantrag wurde vom Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz gemäß §8 Tierschutzgesetz (in der Fassung der Bekanntmachung vom 18.05.2006, BGBl. I Nr. 25 vom 31.05.2006 S.1206; 1313) mit der Register-Nummer 02-027/10 genehmigt.

Die ethischen Richtlinien der International Association for The Study of Pain (IASP) zum Umgang mit Versuchstieren bei der Schmerztestung (ZIMMERMANN, 1983) wurden für die Planung und Durchführung berücksichtigt.

#### **3.2 Haltung und Fütterung**

Die Versuchstiere wurden im Tierstall des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Jena in einer offenen Haltung mit personenbeschränkter Zutrittskontrolle gehalten, die Versuche wurden im angeschlossenen S1-Labor durchgeführt.

Dabei erfolgte die Unterbringung in Gruppen zu maximal 5 Tieren in Makrolon®-Käfigen Typ IV auf entstaubtem Weichholzgranulat unter einem konstanten 12 Stunden Hell-/Dunkelrhythmus bei einer Raumtemperatur von  $22 \pm 2$  °C. Den Tieren stand standardisiertes pelletiertes Haltungsfutter (Altromin-Haltungsdiet Ratten/Mäuse, Alleinfuttermittel für Versuchstiere, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland) sowie Leitungswasser *ad libitum* zur Verfügung.

### 3.3 Allgemeiner Versuchsablauf

#### 3.3.1 Gruppeneinteilung

Die Zuordnung der Versuchstiere zu den verschiedenen Versuchsgruppen erfolgte zufällig (Randomisierung).

Um ein aussagekräftiges Injektionsschema zur Verfügung zu haben, wurden diesbezüglich Vorversuche an folgenden Gruppen durchgeführt:

- **Gruppe 1** ( $n=10$ ): einmalige autologe intraartikuläre Vollblut-Injektion  
**Kontrollgruppe** ( $n=8$ ): einmalige intraartikuläre Injektion von 0,9%iger physiologischer Kochsalzlösung (NaCl-Lsg)  
(NaCl 0,9%, isotone Natriumchloridlösung 0,9% Braun, Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland )  
(s. auch Abb. 3.1)
- **Gruppe 2** ( $n=9$ ): mehrmalige autologe intraartikuläre Vollblut-Injektion  
**Kontrollgruppe** ( $n=9$ ): mehrmalige intraartikuläre Injektion von 0,9%iger NaCl-Lsg  
(s. auch Abb. 3.2)

In Abhängigkeit von den Ergebnissen der Vorversuche (Gruppen 1 und 2) erfolgte die Wahl des Injektionsschemas (einmalig/mehrmalig) für die weiteren Versuche (Gruppen 3 bis 5). Es wurde das Schema übernommen, das besonders deutliche Veränderungen des schmerz-assoziierten Verhaltens bewirkte.

- **Gruppe 3** ( $n=9$ ): mehrmalige intraartikuläre Injektion von Blutplasma
- **Gruppe 4** ( $n=9$ ): mehrmalige intraartikuläre Injektion von zellulären Blutbestandteilen
- **Gruppe 5** ( $n=5$ ): mehrmalige intraartikuläre Injektion von Lithium-Heparinhaltiger NaCl-Lsg (NaCl-LiHep)

### **3.3.2 Zeitlicher Ablauf**

Allen Tieren wurde nach Anlieferung eine Eingewöhnungszeit von einer Woche gewährt.

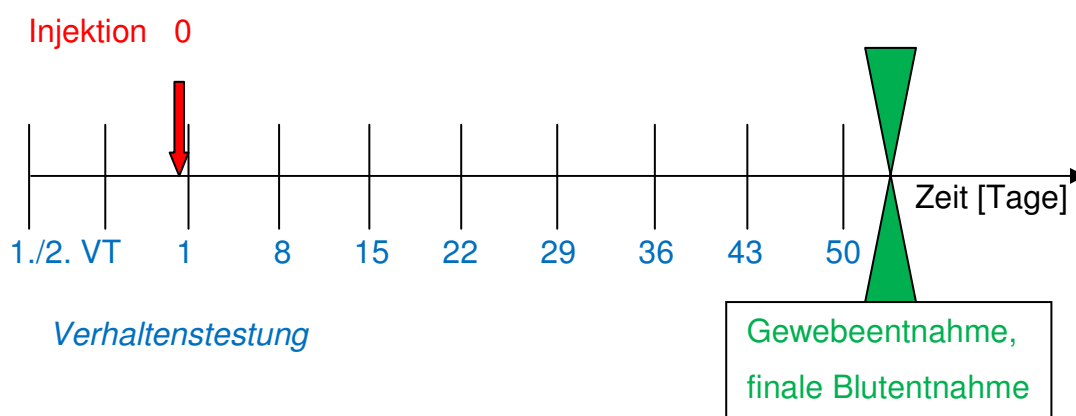
Im Anschluss daran wurde zunächst zweimal im Abstand von einer Woche je eine Verhaltenstestung (s. 3.5) vor Auslösung der Blut-induzierten Ar-thropathie (BIA) durchgeführt. Diese Testungen werden im Folgenden als Vortest (VT) 1 und 2 bezeichnet. Zum einen sollten die Tiere hierbei an die Testapparaturen und die durchführenden Menschen gewöhnt werden, zum anderen dienten diese Vortests der Aufzeichnung des Normalverhaltens von unbehandelten Tieren. Des Weiteren wurden an diesen beiden Testtagen ebenfalls zum Vergleichszweck das Körpergewicht sowie der Durchmesser des linken und rechten Kniegelenks bestimmt (s. 3.5.1).

### 3.3.2.1 Einmalige Injektion

Der zeitliche Ablauf der Vorversuche mit einmaliger Injektion von Vollblut oder NaCl-Lsg (Kontrolle) ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

Es erfolgten hierbei die einmaligen intraartikulären Injektionen am Tag 0, d.h. eine Woche nach dem 2. VT. Weitere zusätzliche Verhaltenstestungen schlossen sich am Tag 1 und dann im wöchentlichen Abstand über insgesamt sieben Wochen an, sodass das Verhalten der Tiere insgesamt zehnmal getestet wurde.

Am Tag 50 nach der Injektion wurden die Versuchstiere im Anschluss an die letzte Verhaltenstestung getötet und die zu untersuchenden Proben und Gewebe entnommen (s. 3.6).

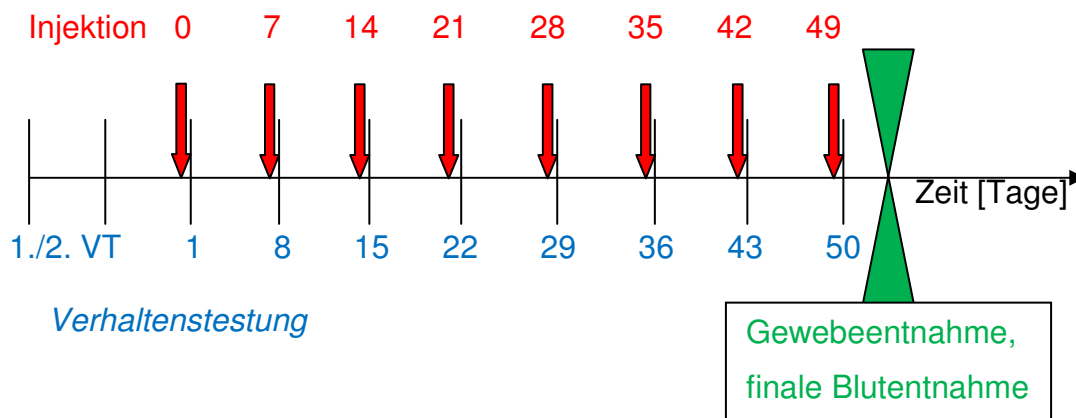


**Abbildung 3.1:** Zeitlicher Ablauf der Vorversuche mit einmaliger Injektion (Gruppe 1 und Kontrollgruppe).

VT – Vortest

### 3.3.2.2 Mehrmalige Injektion

Abbildung 3.2 zeigt den Versuchsablauf bei mehrmaliger Injektion. Zunächst wurde ebenfalls am Tag 0 intraartikulär injiziert. Anschließend erfolgte in wöchentlichen Abständen, und zwar jeweils 24 Stunden vor der nächsten Verhaltenstestung, eine weitere Injektion. Die Tötung am Tag 50 erfolgte analog wie bei der einmaligen Injektion beschrieben (s. 3.3.2.1).



**Abbildung 3.2:** Zeitlicher Ablauf der Vorversuche (Gruppe 2 und Kontrollgruppe) und aller weiteren Versuche (Gruppe 3-5) mit mehrmaliger Injektion.

VT – Vortest

### **3.4 Versuchstechnische Maßnahmen zur Einleitung einer Blut-induzierten Arthropathie**

Grundlage für die durchgeführten Versuche war das etablierte Modell der Blut-induzierten Arthropathie (BIA) bei der Ratte (NIIBAYASHI et al., 1995).

#### **3.4.1 Kurznarkose**

Sowohl die Blutentnahme als auch die intraartikuläre Injektion erfolgten unter Inhalations-Monoanästhesie mit Isofluran (Isofluran Delta Select, Delta Select GmbH, Dreieich, Vertrieb Zweigniederlassung Pfullingen, Deutschland) in einem halbgeschlossenen Kreissystem. Die Narkoseeinleitung erfolgte in einer gefluteten Ganzkörperkammer bei einer Isofluran-Konzentration von 3 Vol.-%. Nach Verlust des Stellreflexes wurde die Narkose für die Dauer der Blutentnahme und der intraartikulären Injektion (ca. 2 bis 3 Minuten) über eine Nasenkammer aufrecht erhalten, wobei für die Blutentnahme eine Isofluran-Konzentration von 2 Vol.-% und für die intraartikuläre Injektion von 3 Vol.-% eingestellt wurde.

#### **3.4.2 Blutentnahme**

Die Entnahme des Blutes zur intraartikulären Injektion erfolgte aus der lateralen Schwanzvene (Vena coccygica) im Bereich des Übergangs vom mittleren zum distalen Schwanzdrittel.

Um eine Vasodilatation zu begünstigen, wurden die Tiere vor Narkoseeinleitung in ihrem Käfig mit einer 100 Watt Infrarotlampe (Sanitas<sup>®</sup> Typ SIL 05, Hans Dinslage GmbH, Uttenweiler, Deutschland) mit ausreichendem Sicherheitsabstand bestrahlt. Im narkotisierten Zustand wurde der Schwanz dann für 5 bis 10 Sekunden in etwa 45 °C warmes Wasser getaucht, um eine gezielte lokale Hyperämie der Schwanzvenen herbeizuführen. Anschließend wurde die Vene mittels eines selbst konstruierten elastischen Staustricks an der Schwanzbasis angestaut. Nach Hautdesinfektion (Softasept<sup>®</sup>N, Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) erfolgte eine Punktion mit einer 26G x 1/2"-Kanüle (Sterican<sup>®</sup> Einmal-Injektions-Kanüle, Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) unter Aspiration mittels aufgesetzter 1ml-Spritze (Omnifix<sup>®</sup>-F Tuberkulin Luer Solo, Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland).

Jedem Tier der Gruppe 1 und 2 wurde ein Volumen von 0,13 bis 0,15 ml Blut abgenommen, die autologe intraartikuläre Injektion erfolgte jeweils unmittelbar nach Entnahme in derselben Narkose (s. 3.4.3.1). Zur wiederholten Kniegelenksinjektion

(Gruppe 2) wurde somit an jedem Versuchstag bei allen Versuchstieren eine erneute Blutentnahme durchgeführt.

Für die Tiere der Gruppe 3 und 4 betrug das entnommene Volumen 0,3 ml, wobei analog der Gruppe 2 eine wiederholte Entnahme stattfand. Der Versuchsaufbau erforderte hier eine Antikoagulation mit anschließender Auftrennung in Blutplasma und zelluläre Blutbestandteile vor der intraartikulären Injektion, die daher in einer zweiten Kurznarkose durchgeführt wurde (s. 3.4.3.2).

### 3.4.3 Intraartikuläre Kniegelenks-Injektion

Die intraartikulären Injektionen erfolgten in das linke Kniegelenk der Versuchstiere. Hierbei wurde nach sorgfältiger Desinfektion mit 95%-Ethanol jeweils ein Volumen von 0,1 ml pro Injektion mit einer 27G x 1/2“-Kanüle (Sterican® Einmal-Injektions-Kanüle, Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) durch das Ligamentum patellae rasch in den Gelenkspalt injiziert (s. Abb. 3.3).



**Abbildung 3.3:** Intraartikuläre Injektion von 0,1 ml

#### 3.4.3.1 Autologes Vollblut

Bei den Gruppen 1 und 2 verblieb das Blut nach der Entnahme ohne Zusatz von gerinnungshemmenden Substanzen in der Spritze. Nach Wechsel der Kanüle wurde 0,1 ml natives Vollblut möglichst rasch vor Einsetzen der Gerinnung demselben Tier autolog injiziert.

Sowohl die Blutentnahme als auch die intraartikuläre Injektion wurde für jedes Tier der Gruppe 2 (mehrmalige Vollblut-Injektion) an jedem Versuchstag wiederholt.

### 3.4.3.2 Autologe Blutbestandteile

Zur Gewinnung der Blutbestandteile (Gruppen 3 und 4) erfolgte die Blutentnahme wie beschrieben (s. 3.4.2). Die entnommenen 0,3 ml Blut jedes Versuchstieres wurden dann unmittelbar nach Entnahme in je ein Lithium-Heparin-Blutröhrchen mit entsprechendem Fassungsvermögen (Microvette<sup>®</sup> 300 LH, Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nürnbrecht, Deutschland) überführt und zur gleichmäßigen Durchmischung mit dem Antikoagulans mehrmals geschwenkt.

Anschließend erfolgte eine Zentrifugation gemäß Empfehlung des Herstellers bei 2000 x g für 5 min bei Raumtemperatur in einer Heraeus<sup>®</sup>-Biofuge 13 (Rotornummer #3757, Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland), um eine Auftrennung in Blutplasma und zelluläre Bestandteile zu erreichen.

Um eine Vergleichbarkeit der Daten mit denen der Tiere der anderen Versuchsgruppen zu ermöglichen, sollte einerseits das Injektionsvolumen von 0,1 ml nicht verändert werden. Zum anderen wurde beabsichtigt den Versuchsratten eine äquivalente Menge der einzelnen Komponenten, wie sie in 0,1 ml Vollblut enthalten sind, ins Gelenk zu injizieren. Folglich erforderte diese Absicht eine Verdünnung des Blutplasmas bzw. der zellulären Bestandteile (s. Abb. 3.4).

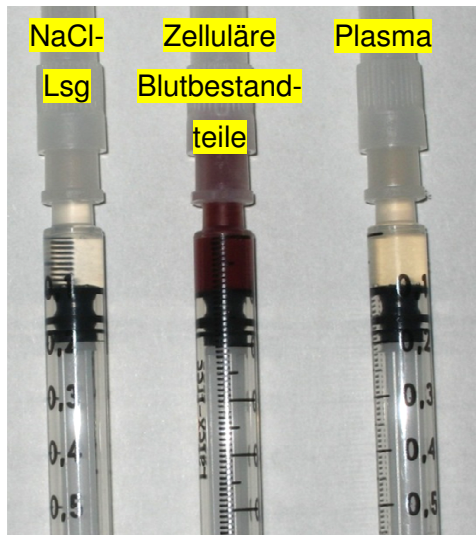
Als Grundlage für die Herstellung einer Plasmaverdünnung wurde der Hämatokrit der Ratte von 37,6 – 50,6 Vol.-% bzw. 0,37 – 0,5 l/l zugrunde gelegt (LINDSEY, 1979; WIJNBBERGEN, 2007). Um eine praktikable Durchführbarkeit zu gewährleisten, wurde ein Hämatokrit von 40% angenommen.

Für die Herstellung von 0,1 ml Plasmaverdünnung wurde somit 0,06 ml Plasma mit 0,04 ml NaCl-Lsg aufgefüllt.

Für die Herstellung der zellulären Blutbestandteil-Verdünnung wurde zunächst das Plasma komplett entfernt und die zellulären Bestandteile mit einem dem entnommenen Plasmavolumen äquivalenten Volumen an NaCl-Lsg resuspendiert. Von der entstandenen Suspension wurden dann wiederum 0,1 ml zur Injektion entnommen, wobei analog dem Vorgehen bei den Gruppen 1 und 2 eine streng autologe Injektion in einer erneuten Kurznarkose erfolgte.

Dieses Verfahren wurde bei jedem einzelnen Tier an allen Injektionstagen wiederholt, eine Konservierung oder Lagerung des entnommenen Vollblutes bzw. der aufgetrennten Bestandteile erfolgte nicht.





**Abbildung 3.4:** Zur Injektion vorbereitete Verdünnungen der Blutbestandteile mit je 0,1 ml Volumen

### 3.4.3.3 Kontrollgruppen

Den Kontrolltieren zu den Gruppen 1 und 2 (Vollblut-Injektion) wurden jeweils 0,1 ml NaCl-Lsg intraartikulär injiziert.

Zur Gewinnung der Injektionslösung für die Tiere der Gruppe 4 (NaCl-LiHep) wurden die in 3.4.3.2 beschriebenen Microvetten<sup>®</sup> mit 0,3 ml NaCl-Lsg gefüllt und analog dem Vorgehen nach der Blutentnahme geschwenkt, um eine Anreicherung des Lithium-Heparins in der NaCl-Lsg zu erreichen. Anschließend wurden daraus 0,1 ml zur Injektion entnommen.

## 3.5 Messungen am etablierten Modell

### 3.5.1 Kniegelenkschwellung und Körpergewicht

Um eine mögliche Gelenkschwellung als klinisches Maß für den Grad einer Entzündung zu erfassen, wurde zu den jeweiligen Testtagen der mediolaterale Durchmesser (D) des linken und des rechten Kniegelenkes mit einem Oditest-Schnelltaster (Mitutoyo, Neuss, Deutschland) auf 0,01 mm genau gemessen (s. Abb. 3.5).

Durch Subtraktion der beiden Werte errechnet sich die Schwellung des linken Kniegelenkes (S):

$$S (\text{Knie}_{\text{links}})[\text{mm}] = D (\text{Knie}_{\text{links}}) - D (\text{Knie}_{\text{rechts}})$$



**Abbildung 3.5:** Messung des Durchmessers des linken Kniegelenkes

Außerdem wurde das Körpergewicht als allgemeiner Morbiditätsparameter sowohl an den beiden Vortesttagen als auch an den einzelnen Testtagen ermittelt. Das Gewicht an den Testtagen wurde jeweils auf das Ausgangsgewicht (Gewicht VT2) bezogen und daraus dann die prozentuale Zunahme berechnet, um die Bedeutung unterschiedlicher Ausgangsgewichte zu neutralisieren:

$$\text{Zunahme}_{\text{Tag } X} [\%] = \frac{\text{Gewicht Tag } X - \text{Gewicht VT2}}{\text{Gewicht VT2}} \times 100 \%$$

### **3.5.2 Testung des schmerz-assoziierten Verhaltens**

Bei allen nachfolgend genannten Methoden zur Beschreibung des schmerzassoziierten Verhaltens wurden die Schmerzschwellen für verschiedene noxische Reize gemessen. Die Versuchstiere konnten den entsprechenden Reiz dabei selbst durch Zurückziehen der betroffenen Extremität terminieren, sodass keine persistierenden Schmerzen entstanden sind.

### 3.5.2.1 Messung der primären mechanischen Hyperalgesie

Die Testung auf primäre mechanische Hyperalgesie wurde mit einem sogenannten Pressure Application Measurement-Gerät (P.A.M. 38500, Ugo Basile, Comerio, Italien) durchgeführt.

Dieses Gerät bietet die Möglichkeit, analog des in der Humanmedizin eingesetzten Druck-Dolorimeters, die Hypersensibilität eines Gelenks objektiv zu quantifizieren (BARTON et al., 2007). Es wurde speziell zur Anwendung am Knie- bzw. Sprunggelenk von Ratten und Mäusen konstruiert und hinsichtlich der Detektion einer primären Hyperalgesie in einem Arthritis-Modell validiert (LEUCHTWEIS et al., 2010).

Gegenüber einem analogen Dolorimeter bietet das P.A.M.-Gerät den Vorteil, dass die Geschwindigkeit des Druckanstiegs kontrolliert und reproduzierbar erfolgt. Das Gerät gibt visuell eine lineare Kurve vor, anhand derer die Druckintensität durch den Untersucher gleichmäßig erhöht wird. Der Druck wird dabei über einen kreisförmigen Druckapplikator mit 8 mm Durchmesser, der mittels einer Fingerschlaufe am Finger befestigt wird, mechanisch ausgeübt (s. Abb. 3.6). Durch die stumpfe Konstruktion und den großen Durchmesser des Applikators werden insbesondere Nozizeptoren tief liegender Gewebe (Muskulatur, artikuläre Strukturen) stimuliert und es wird die unerwünschte Stimulation kutaner Rezeptoren minimiert (TREEDE et al., 2002). Die aufgewendete Gewichtskraft (maximal 1500g) wird vom Gerät in Gramm gemessen. Die zu testende Ratte wurde in einem Wollsocken leicht fixiert, in den die Tiere instinktiv hineingehen, da sie die Dunkelheit suchen. Der auf den Zeigefinger aufgesetzte Druckapplikator wurde bei leichter Streckung des Gelenks lateral am Kniegelenk platziert, der Daumen als Gegendruck medial (s. Abb. 3.6). Entsprechend der Displayanzeige wurde dann ein in der Intensität allmählich ansteigender Druck (etwa 50 g/s) ausgeübt, bis das Tier die Extremität wegzuziehen versuchte bzw. Vokalisation oder andere Anzeichen für Schmerz zeigte. Da die Ratte dabei in der Hand des Untersuchers ruhte und das Bein mit den anderen Fingern leicht gestreckt wurde, war bereits das kleinste Anzeichen von Unbehagen gut feststellbar. Bei Anzeichen von Schmerzen wurde der Druck auf das Kniegelenk unmittelbar beendet; das Gerät stoppt dann automatisch die Messung und zeigt die zu diesem Zeitpunkt ausgeübte Kraft an (Druckschmerzschwelle).

An jedem Testtag wurde jeweils für das linke und das rechte Kniegelenk (Kontrolle) nur ein Wert gemessen, da eine mehrmalige Messung zu einer Sensibilisierung und damit zur artifiziellen Erniedrigung des Schwellenwertes führen würde.



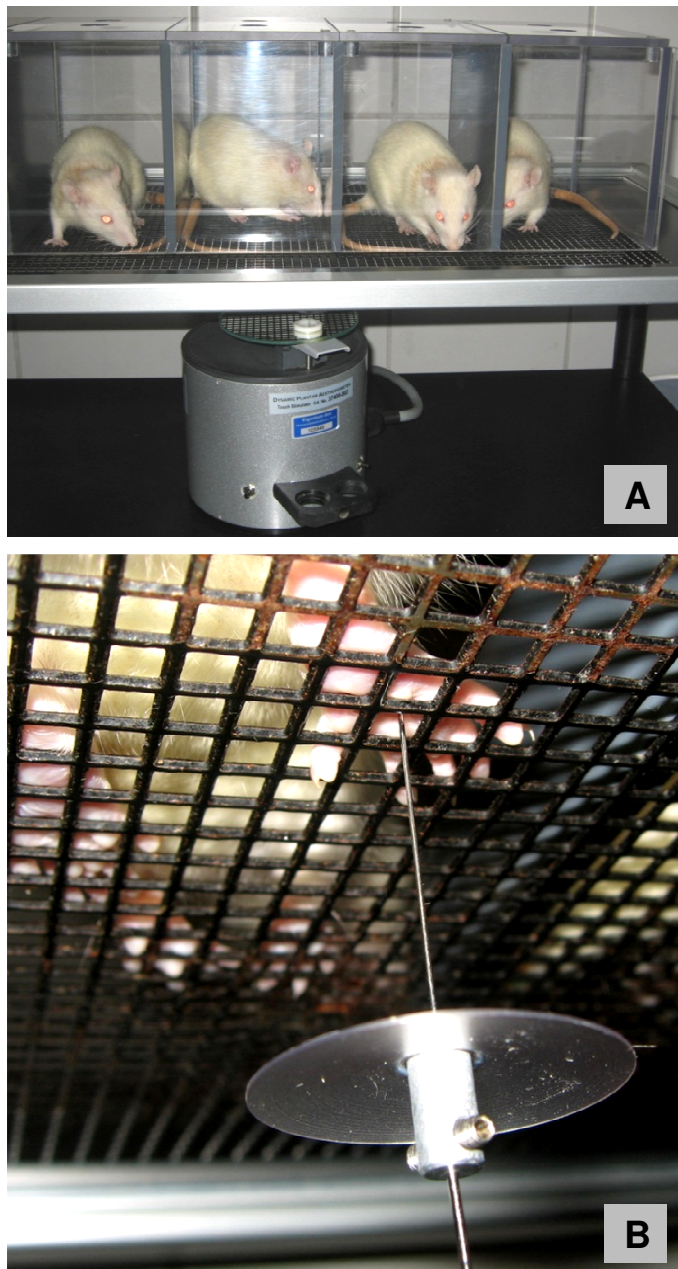
**Abbildung 3.6:** Bestimmung der Druckschmerzschwelle am linken Kniegelenk einer Ratte mit P.A.M.

### 3.5.2.2 Messung der sekundären mechanischen Hyperalgesie

Neben der primären Hyperalgesie wurde zudem untersucht, ob es bei der BIA zu einer sekundären mechanischen Hyperalgesie kommt. Hierzu wurde die Sensibilität auf einen definierten taktilen Reiz mittels eines dynamischen plantaren Ästhesiometers (DPA, Dynamic Plantar Aesthesiometer<sup>®</sup> 37450, Touch Stimulator Cat. No. 37400-002, Ugo Basile, Comerio, Italien) bestimmt. Das DPA beruht auf dem Prinzip der von Frey-Haaruntersuchung (VON FREY, 1996). Von Frey-Filamente werden in der Humanmedizin bei der Diagnose von neurologischen Störungen eingesetzt, um eine Allodynie zu erkennen. Das Prinzip wird im DPA automatisiert angewendet, mit dem Vorteil, dass die Pfote lediglich einmal stimuliert werden muss, um einen Schwellenwert zu erhalten. Anstatt mehrerer Filamente mit steigender Dicke wird hier ein automatisiertes, starres, stumpfes Metall-Filament verwendet (Durchmesser 0,5 mm). Dieses drückt mit steigender Gewichtskraft von plantar auf die Sohle der zu testenden Pfote (s. Abb. 3.7B). Sobald das Tier die Pfote anhebt und somit Schmerz anzeigt, stoppt die Messung automatisch. Das DPA erfasst dabei die Latenzzeit bis zum Wegziehen der Pfote (mechanische Latenz) in Sekunden sowie die dabei erreichte Gewichtskraft in Gramm.

Die Ratten wurden dazu in Plexiglasboxen mit Deckel gesetzt, die auf einem erhöhten Drahtgitterboden platziert wurden (s. Abb. 3.7A). Unter diesem Drahtgeflecht konnte das Ästhesiometer frei bewegt werden und exakt unter der Pfote des zu testenden Tieres platziert werden (s. Abb. 3.7A, B). Vor Beginn der Messungen wurde den Versuchstieren Zeit (ca. 5 - 10 min) gelassen, sich an ihre Umgebung zu gewöhnen. Mit der Testung wurde erst begonnen, nachdem die Tiere sich beruhigt hatten. Das Gerät wurde dabei so eingestellt, dass sich die Steigerung der Gewichtskraft über 20 Sekunden vollzog und maximal ein Druck von 50 Gramm erreicht wurde (konstanter Stimulusanstieg mit einer Rate von 2,5 g/s). Es wurden jeweils 5 bis 6 Tiere parallel getestet, sodass zwischen den einzelnen Messungen genügend Zeit lag. Zudem wurden linke und rechte Pfote im Wechsel getestet, um unverfälschte Messwerte zu erhalten.

An jedem Testtag wurden je 3 Messungen an der linken und je 3 an der rechten Pfote (Kontrolle) durchgeführt. Aus den gemessenen Werten wurde ein Mittelwert für die linke und die rechte Pfote gebildet.



**Abbildung 3.7:** (A) Versuchsaufbau des dynamischen plantaren Ästhesiometers (DPA) und (B) Sicht von plantar auf die Pfote während einer automatisierten Messung mit dem stumpfen Metallfilament des DPA

### 3.5.2.3 Messung der sekundären thermischen Hyperalgesie

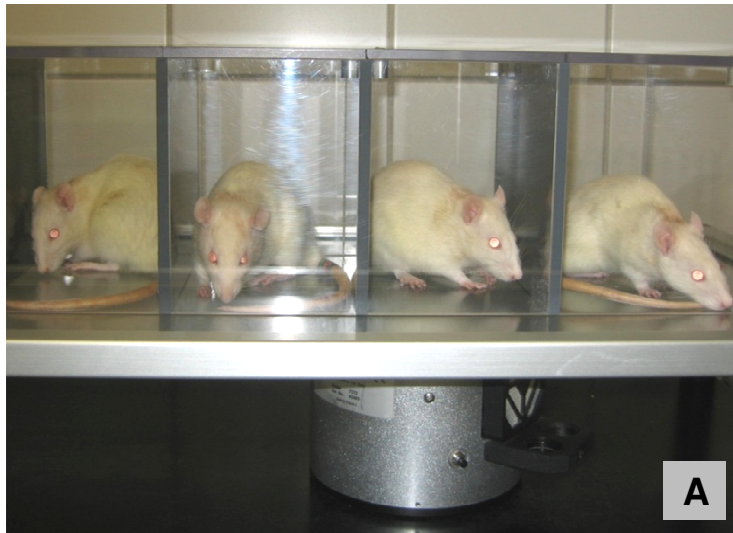
Um die Ausbildung einer thermischen Hyperalgesie bei der BIA zu untersuchen, wurde der sogenannte Plantar Test 7371 (Ugo Basile, Comerio, Italien) eingesetzt. Das dabei angewandte Testprinzip beruht auf einer von Hargreaves erstmals beschriebenen Hitzestimulation (HARGREAVES et al., 1988).

Beim Plantar Test wird der Hitzereiz von einem beweglichen Infrarot (I.R.)-Generator erzeugt. In diesem zylindrischen Generator befindet sich eine Halogenlampe. Ein darüber angebrachter I.R.-Filter absorbiert sichtbares Licht. Die verbleibenden I.R.-Wellen werden gebündelt und nach Druck auf den Startknopf über ein in einem Fadenkreuz positionierten Austrittsfenster fokussiert freigesetzt (s. Abb. 3.8C). Bei den Versuchen im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Infrarot-Intensität von 50 Watt/Sekunde verwendet (s. Abb. 3.8B). Sobald das Tier den Hitzereiz als schmerzhaft wahrnimmt und den Fuß anhebt, wird über eine eingebaute Lichtschranke die Messung automatisch gestoppt. Die Latenzzeit bis zum Anheben wird vom Plantar Test gemessen und auf 0,1 Sekunden genau angezeigt (Hitzelatenz) (s. Abb. 3.8B).

Die Versuchstiere wurden zur Durchführung in Plexiglasboxen mit Deckel gesetzt, die auf einer Plexiglasplatte positioniert wurden (s. Abb. 3.8A). Darunter konnte der I.R.-Generator frei bewegt werden und mithilfe des Fadenkreuzes exakt unter der Hinterpfote des jeweiligen Tieres positioniert werden (s. Abb. 3.8C). Nach einer für die jeweilige Tiergruppe individuellen Adaptationszeit, die nötig war bis alle Tiere ruhig in ihren Boxen saßen, wurde mit dem Test begonnen. Es wurden jeweils 5 bis 6 Tiere zeitgleich getestet, wobei abwechselnd die linke und die rechte Pfote stimuliert wurde, sodass genügend lange Pausen für das einzelne Tier gegeben waren.

Um Gewebeschädigungen zu vermeiden, wurde eine maximale Hitzeeinwirkung von 20 Sekunden vorgegeben. Pro Versuchstag wurden je Hinterpfote 3 Messungen durchgeführt, aus denen jeweils ein Mittelwert für die linke und die rechte Seite ermittelt wurde.





**Abbildung 3.8:** (A) Versuchsaufbau für die Messung der thermischen Hyperalgesie und (B) Steuereinheit des Plantar Tests mit Anzeige der Latenzzeit (Reaction Time, rot) und der I.R.-Intensität (I.R. Intensity, weiß) sowie (C) exakt platziertem Fadenkreuz

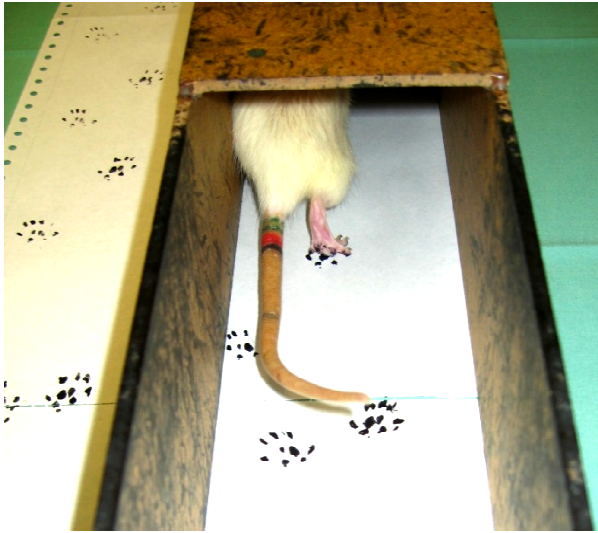
### 3.5.2.4 Dynamische Testung durch Bewertung des Gangbildes

Um eventuelle funktionelle Einschränkungen im Zuge der BIA zu detektieren, wurde eine Analyse des Gangbildes vorgenommen. Zudem hat sich in verschiedenen Arthritis-Modellen gezeigt, dass Veränderungen im Gangbild mit schmerzhaften Veränderungen korrelieren (ROCHA et al., 1999; SIMJEE et al., 2007). Diese Methode zur Beurteilung des motorischen Verhaltens wurde erstmals durch De Medinaceli (DE MEDINACELI et al., 1982) beschrieben.

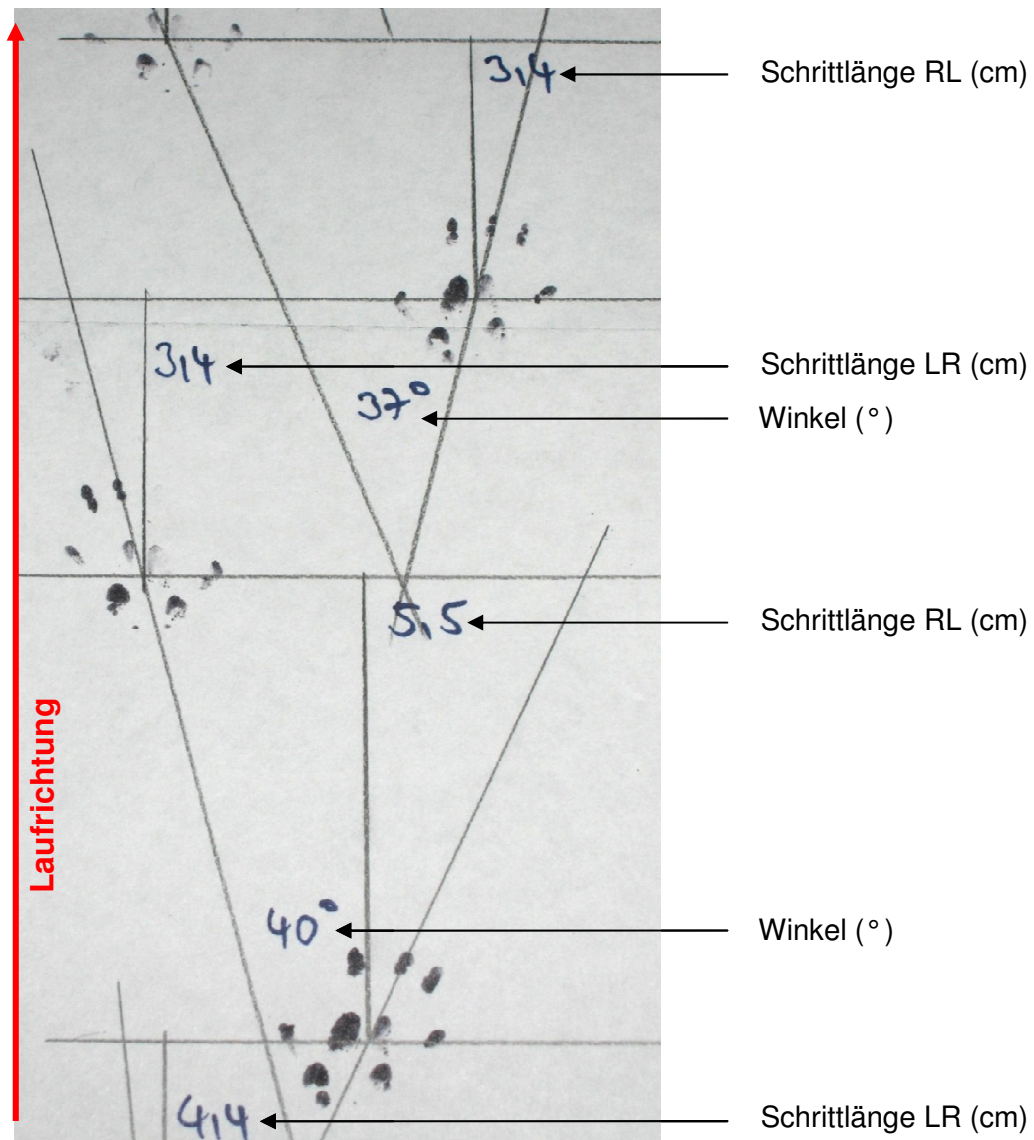
Bei den hier durchgeführten Versuchen wurde eine modifizierte Form dieser Methode verwendet, bei der die Hinterpfoten der Ratte mit Stempelfarbe (Barock®-Stempelfarbe, ölfrei, Barock Bürobedarf GmbH, Dresden, Deutschland) markiert werden (BOETTGER et al., 2009). Die zu testende Versuchsratte wurde hierzu in das offene Ende eines Tunnels gesetzt, der auf einer Lage Druckerpapier stand. Das Tier lief dann seinem Instinkt folgend zum dunklen Ende des Tunnels und hinterließ dabei seine Pfotenabdrücke auf dem Papier (s. Abb. 3.9). Diese konnten dann von Hand ausgewertet werden.

Dabei wurden folgende Parameter bestimmt (s. Abb. 3.10): die Schrittlänge als Abstand zwischen linkem und rechtem Mittelballen (LR), zwischen rechtem und linken Mittelballen (RL) sowie die Außenrotation der Hintergliedmaße. Die Außenrotation wird gemessen als Winkel zwischen einer Linie durch Mittelballen und 3. Zehe der linken und einer zweiten solchen Linie durch die rechte Hinterpfote. Für die Beurteilung wurden dann Außenrotation und LR verwendet. Zur Auswertung herangezogen wurden nur Abdrücke, bei denen die Tiere fortlaufend und mindestens 3 Schritte am Stück gelaufen waren.

Pro Testtag und Versuchstier wurden jeweils 2 Laufstrecken ausgewertet und aus den gemessenen Parametern Mittelwerte gebildet.



**Abbildung 3.9:** Versuchstier, das beim Laufen in den Tunnel seine Pfotenabdrücke hinterlässt. Links die bereits gelaufene erste Stecke.



**Abbildung 3.10:** Analyse der Pfotenabdrücke.  
 LR – Abstand links-rechts, RL – Abstand rechts-links.

### 3.5.2.5 Testung mittels einer Score-Vorgabe

Des Weiteren wurde das Laufverhalten noch mittels einer Score-Vorgabe evaluiert, bei der eine Schonung oder Lahmheit der betroffenen Hintergliedmaße semiquantitativ erfasst wird.

Die Gradeinteilung erfolgte hierbei wie folgt (BOETTGER et al., 2009):

**Score 0:** keine Lahmheit

**Score 1:** Lahmheit nach lateralem Druck auf das Kniegelenk (s. 3.5.2.1)

**Score 2:** sichtbare Lahmheit ohne schmerzhaftes Stimulation

**Score 3:** komplette Schonung der Gliedmaße (kein Auftreten)

**Score 4:** keine Fortbewegung, allgemeine Morbidität

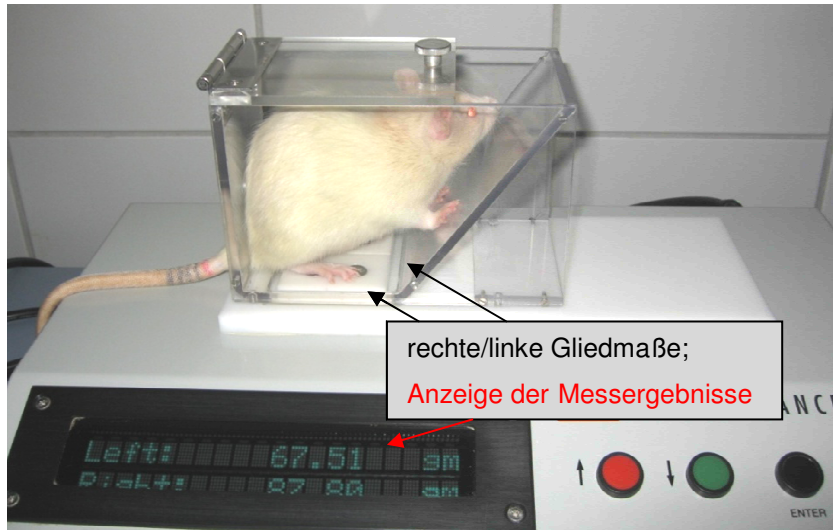
### 3.5.2.6 Statische Testung

Um eine schmerzbedingte Entlastung der injizierten Hinterextremität mit Gewichtsverlagerung auf die gesunde Gliedmaße zu erkennen, wurde die spontane Belastung der Hintergliedmaßen mit einem Incapacitance-Tester (Linton Instrumentation, Norfolk, Großbritannien) gemessen. Der Incapacitance-Tester misst den Auflagedruck separat für die linke und rechte Hintergliedmaße über zwei Präzisionswaagen (Druck-Messfühler) in Gramm. Hierfür wurden die Versuchstiere in eine Plexiglaskammer gesetzt, die so gebaut war, dass die Hinterpfoten auf der Plattform mit den Druck-Messfühlern zu stehen kamen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die jeweilige Pfote zentral auf der jeweiligen Messplatte platziert war und der Druck nicht auf die Wände der Kammer verteilt wurde (s. Abb. 3.11). Der durchschnittliche Auflagedruck wurde über eine Dauer von 3 Sekunden bestimmt. Pro Tier und Testtag wurden insgesamt 3 aufeinanderfolgende Messungen durchgeführt, aus denen ein Mittelwert gebildet wurde.

Anstatt die Werte der ipsi- und kontralateralen Hintergliedmaße in ein Verhältnis zueinander zu setzen (BARTON et al., 2007), wurde aus den Mittelwerten die prozentuale Belastung der linken (injizierten) Gliedmaße ( $Bel_{links}$ ) errechnet (MCDUGALL et al., 2006):

$$Bel_{links}[\%] = \frac{\text{Gewicht linke Pfote}}{\text{Gewicht linke Pfote} + \text{Gewicht rechte Pfote}} \times 100 \%$$

Bei physiologischer gleichmäßiger Belastung wäre der Auflagedruck symmetrisch, was zu einer  $Bel_{\text{links}}$  von 50% führen würde. Bei Schonung der injizierten Gliedmaße würde sich ein Wert entsprechend kleiner 50% ergeben.



**Abbildung 3.11:** Ratte auf dem Incapacitance-Tester

### **3.6 Finale Blut- und Gewebeentnahme sowie Tötung der Versuchstiere**

Die Ratten wurden am Tag 50, im Anschluss an die letzte Verhaltenstestung, getötet. Um eine finale kardiale Blutentnahme zu ermöglichen, wurden die Versuchstiere zunächst mit dem Hypnotikum Trapanal<sup>®</sup> (Thiopental, Byk-Gulden, Konstanz, Deutschland) anästhesiert. Dieses kurzwirksame Thiobarbiturat ermöglicht eine Anästhesie bei stabilen Kreislaufverhältnissen (ERHARDT & HENKE, 2004), wodurch die kardiale Blutentnahme erleichtert wird. Den Versuchstieren wurde eine Dosis von etwa 40 mg/kg i.p. (ERHARDT & HENKE, 2004) verabreicht, wobei individuell nachdosiert wurde, bis der Zwischenzehen- und der Schwanzreflex nicht mehr auslösbar waren.

Es wurden dann mit einer 5ml-Spritze (Injekt<sup>®</sup> Solo, Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) mit aufgesetzter 24G x 1“ Kanüle (Sterican<sup>®</sup> Einmal-Injektions-Kanüle, Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) 5 ml Blut durch Herzpunktion entnommen. Um einen endgültigen Herzstillstand herbeizuführen, wurde direkt nach der Blutentnahme Kaliumchlorid-Lösung intrakardial nach Wirkung verabreicht.

### 3.6.1 Serumgewinnung

Das kardial entnommene Blut wurde unmittelbar nach Entnahme in Serumröhrchen (Serum-Gel, S-Monovette<sup>®</sup> 4,9ml Z-Gel, Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nürmbrecht, Deutschland) überführt.

Die Monovetten<sup>®</sup> wurden dann geschwenkt und der Ablauf der Gerinnung abgewartet. Nach Herstellerangabe erfolgte anschließend zur Serumseparation eine Zentrifugation (Megafuge 1.0, Heraeus Instrumants, Osterode, Deutschland) bei Raumtemperatur bei 2500 x g für 10 Minuten. Das Serum wurde in Eppendorf-cups abpipetiert und bei -20 °C aufbewahrt.

### 3.6.2 Rat C-Reactive Protein (CRP) - Analyse mittels ELISA

Um die Konzentration des C-Reactive Proteins (CRP) im Serum der einzelnen Versuchstiere am Tag 50 zu ermitteln, wurde ein speziesspezifischer quantitativer ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Rat C-Reactive Protein (CRP) ELISA Kit, BD™ ELISA, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ USA) verwendet.

Für die Messung mittels dieses Tests wurde das gewonnene Serum bei 2-8 °C schonend aufgetaut.

CRP ist ein Akute Phase-Protein, das von der Leber insbesondere bei Entzündungszuständen, bakteriellen Infektionen und im Falle von Gewebetraumen vermehrt gebildet wird. Die Quantifizierung des CRP-Gehalts im Serum kann helfen, Entzündungszustände zu erkennen, die sonst leicht übersehen würden (Produktinformationsblatt BD Biosciences).

Die hier verwendete Testkombination beruht auf dem Prinzip eines Festphasen Sandwich-ELISAs. Die Platte ist mit einem spezifischen Antikörper für das CRP der Ratte beschichtet. In der aufgetragenen Probe enthaltenes CRP wird von diesem Antikörper gebunden. Mithilfe eines Anti-CRP-Antikörpers, der mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist, erfolgte nach Zugabe des Substrats der Peroxidase eine Farbreaktion.

Der ELISA wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Extinktion der Proben wurde anschließend bei 450nm mittels eines ELISA-Readers gemessen.

Alle gemessenen Extinktionen wurden durch Subtraktion des Nullwerts (Extinktion des Waschpuffers) korrigiert, um den Anteil von unspezifischen Bindungen zu eliminieren.

Aus den gemessenen Extinktionen der Standardverdünnungen wurde eine Eichgerade erstellt, anhand derer die Konzentrationen von CRP im Serum der einzelnen Versuchstiere berechnet wurden.



### 3.6.3 Entnahme der Kniegelenke

*Post mortem* wurden die beiden Kniegelenke von den umgebenden Muskeln und Geweben freipräpariert, *in toto* entnommen und dann für mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur in gepuffertem Formalin (4%) fixiert (s. Tab 3.1).

**Tabelle 3.1:** Ansatz der gepufferten Formalin (4%)-Lösung

Substanz	Hersteller	Konzentration
<b>Formaldehyd (40%)</b>	Sigma	100 ml/l
<b>Dinatriumphosphat, wasserfrei</b>	Sigma	6,5 g/l
<b>Natrium-Monophosphat (Monohydrat)</b>	Sigma	4 g/l
<b>Aqua destillata</b>	Braun	

#### 3.6.3.1 Aufarbeitung der Gelenke

Nachdem die Kniegelenke zur Fixierung in Formalinlösung aufbewahrt worden waren, wurden die Gelenke in Aluminiumchlorid ( $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) entkalkt. Anschließend erfolgte eine Entwässerung mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (50, 70, 85, 96, 100%) (Rotisol<sup>®</sup>, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland). Nach Xylol-Behandlung (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz) wurden die Gelenke in Paraffin (Histosec<sup>®</sup>, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) eingebettet.

Mithilfe eines Mikrotoms (Leica RM 2045, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) wurden drei bis vier frontale Schnitte des gesamten Gelenks von 2  $\mu\text{m}$  Dicke angefertigt. Vor der Färbung der Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin (Hämatoxylin: Ansatz der Hämaunlösung siehe Tabelle 3.2, Eosin: Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland) wurden die Schnitte noch in Xylol (Fluka) und einer absteigenden Alkoholreihe (100, 96, 85, 70 und 50%) (Rotisol<sup>®</sup>) entparaffiniert. Nun konnten die Schnitte unter dem Lichtmikroskop beurteilt werden.

**Tabelle 3.2:** Ansatz für Mayers Hämalaunlösung (1920) (MULISCH & WELSCH, 2010)

Substanz	Hersteller	Konzentration
Hämatoxylin-Monohydrat	Merck	1 g/l
Natriumiodat	Merck	0,2 g/l
Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat	Merck	50 g/l
Chloralhydrat	Merck	50 g/l
Citronensäure-Monohydrat	Merck	1 g/l

### 3.6.3.2 Histopathologische Bewertung

Die histologische Untersuchung der Kniegelenksschnitte erfolgte durch einen Gutachter, dem die Gruppenzugehörigkeit nicht bekannt war („blind“). Bewertet wurden die Schnitte mittels eines Punktesystems, wobei einerseits akute Entzündungsparameter (s. Tab. 3.3) und andererseits Anzeichen für eine chronische Entzündung (s. Tab. 3.4) in die Beurteilung mit einbezogen wurden. Außerdem wurde der prozentuale Anteil der Destruktion des Gelenks ebenfalls anhand eines Punktesystems beurteilt (s. Tab 3.5).

Der Wert 0 wurde vergeben, wenn keine pathologischen Veränderungen sichtbar waren.

Durch Addition der Werte für die einzelnen Parameter wurde für die drei Hauptkriterien akute Entzündung, chronische Entzündung und Gelenkdestruktion jeweils ein Score ermittelt, anhand dessen dann ein objektiver Vergleich möglich wurde.

**Tabelle 3.3:** Histologische Kriterien der akuten Gelenkentzündung

<b>Bewertung</b>	<b>Exsudat</b>
<b>1</b>	einzelne Granulozyten
<b>2</b>	fleckförmiges Granulozytenexsudat
<b>3</b>	massiv
<b>granulozytäre Infiltration der Synovialmembran</b>	
<b>1</b>	einzelne Granulozyten
<b>2</b>	kleinherdig oder diffus mäßig
<b>3</b>	mittelgradig bis dicht
<b>+ 1</b>	wenn Fibrin deutlich nachweisbar
<b>+ 1</b>	wenn periartikuläres Gewebe mitbetroffen

**Tabelle 3.4:** Histologische Kriterien der chronischen Gelenkentzündung

<b>Bewertung</b>	<b>Synoviale Hyperplasie (Hyperplasie der Deckzellschicht)</b>
<b>1</b>	geringe Hyperplasie, keine Aktivierung der Deckzellen oder keine Hyperplasie, Aktivierung von mehr als 50% der Deckzellen
<b>2</b>	fleckförmige Hyperplasie mit Aktivierung der Deckzellen
<b>3</b>	deutliche Hyperplasie
<b>Mononukleäre Infiltration der Synovialmembran</b>	
<b>1</b>	einzelne Granulozyten
<b>2</b>	kleinherdig oder diffus mäßig
<b>3</b>	mittelgradig bis dicht
<b>+ 1</b>	wenn Fibrin deutlich nachweisbar
<b>+ 1</b>	wenn periartikuläres Gewebe mit betroffen
<b>Periartikuläre Strukturen (Fibrose, Infiltration)</b>	
<b>1</b>	geringe Fibrose/ Infiltration
<b>2</b>	mäßige Fibrose/ Infiltration
<b>3</b>	stark fibrös verbreitert/ dichte entzündete Infiltration

**Tabelle 3.5:** Histologische Kriterien der Gelenkdestruktion

<b>Bewertung</b>	<b>Destruktion Knorpel</b>	<b>Bewertung</b>	<b>Destruktion Knochen</b>
<b>0,5</b>	< 10 %, fokal	<b>0,5</b>	< 10 %, fokal
<b>1</b>	10 – 19 %	<b>1</b>	10 – 19 %
<b>1,5</b>	20 – 39 %	<b>1,5</b>	20 – 39 %
<b>2</b>	40 – 59 %	<b>2</b>	40 – 59 %
<b>2,5</b>	60 – 79 %	<b>2,5</b>	60 – 79 %
<b>3</b>	≥ 80 %	<b>3</b>	≥ 80 %

### 3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der gesammelten Daten erfolgte mithilfe des Programms SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) für Windows, Version 18.0.

Bei allen statistischen Erhebungen wurden einzelne Gruppen zu den jeweiligen Versuchstagen miteinander verglichen.

Zunächst wurden die Daten hierfür mittels Kolmogoroff-Smirnoff-Test auf Normalverteilung überprüft.

Zur Ermittlung von Gruppenunterschieden bei einmaliger Injektion (Gruppe 1) wurden Messwiederholungs-ANOVAs (Analysis of Variance) durchgeführt. Dafür wurde der Zwischen-Subjekt-Faktor „Gruppe“ (Vollblut-Injektion vs. NaCl-Lsg-Injektion) und der Inner-Subjekt-Faktor „Zeit“ (Vortestung, Verhaltenstestung am Tag 1, 8, 15, 22, 29, 36, 42 und 50) definiert.

Um Gruppenunterschiede bei mehrmaliger Injektion (Gruppen 2-5; Vollblut/NaCl-Lsg, Blutbestandteile, NaCl-LiHep) festzustellen, wurden ebenfalls Messwiederholungs-ANOVAs verwendet. Hierfür wurde wiederum der Zwischen-Subjekt-Faktor „Gruppe“ (Substanz, die injiziert wurde: Vollblut, NaCl-Lsg, Plasma, zelluläre Blutbestandteile, NaCl-LiHep) und der Inner-Subjekt-Faktor „Zeit“ (Vortestung, Verhaltenstestung am Tag 1, 8, 15, 22, 29, 36, 42 und 50) definiert.

Zur Beschreibung aller errechneten Daten wurden anschließend zweiseitige post-hoc t-Tests für ungepaarte Stichproben durchgeführt. Dabei wurden die einzelnen Versuchsgruppen sowie die entsprechende Kontrollgruppe jeweils paarweise miteinander verglichen, um zu ermitteln welche Mittelwerte sich an welchen Testtagen signifikant voneinander unterschieden.

Die statistische Analyse der Ergebnisse der histopathologischen Befunde und der Serumwerte (nicht normalverteilt) hinsichtlich etwaiger Gruppenunterschiede erfolgte mittels Chi Quadrat-Test. Im Anschluss daran wurden Mann-Whitney-Tests als deskriptive Statistik angewendet. Außerdem wurden Korrelationen zwischen den Ergebnissen der Verhaltenstestung am Tag 50 (Tag der Kniegelenkentnahme) und den histologischen Befunden mittels bivariater Korrelation nach Pearson durchgeführt.

---

Allgemein wurde für sämtliche Tests ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  angenommen, Werte von  $p \geq 0,05$  wurden als nicht signifikant abgelehnt.

## 4 ERGEBNISSE

Für die Beurteilung sämtlicher Testergebnisse wurden jeweils die Ergebnisse des zweiten Vortests (VT2) herangezogen (Orientierungs- oder Ausgangswerte). Es war anzunehmen, dass die Tiere hier bereits an die Verhaltenstestungen gewöhnt waren. Diese Orientierungswerte werden im Folgenden als VT-Werte bezeichnet. Die Versuchstiere, die NaCl-Lsg injiziert bekamen, dienten als „Kontrolle“. Im Text genannte Zahlenwerte sind gerundet.

## 4.1 Einmalige Injektion von Vollblut (Gruppe 1) und von physiologischer Kochsalzlösung (Kontrollgruppe)

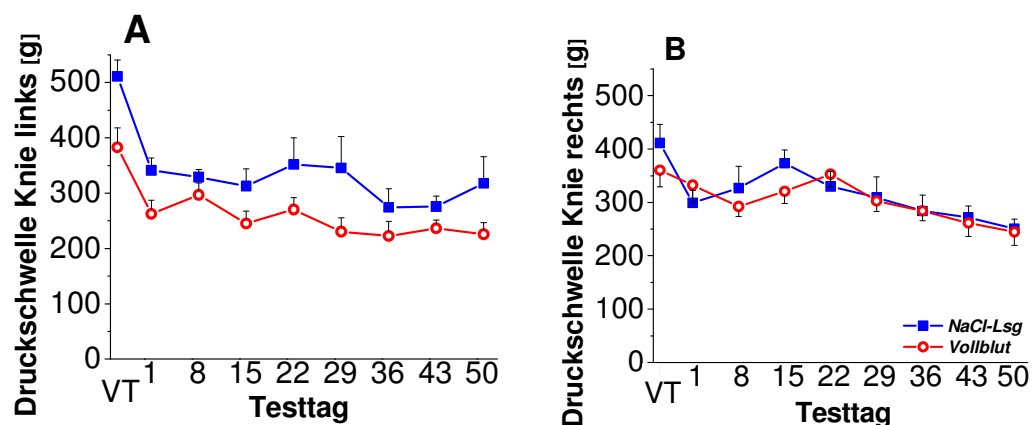
Um den Effekt einer einmaligen Vollblut-Injektion ( $n=10$ ) zu bewerten, erfolgte ein Vergleich mit der Kontrollgruppe (einmalige NaCl-Lsg-Injektion;  $n=8$ ).

### 4.1.1 Primäre Hyperalgesie

Die Messung der Druckschwelle am injizierten, linken Kniegelenk lieferte im untersuchten Testzeitraum keine Hinweise auf die Ausprägung einer primären Hyperalgesie im Vergleich zur NaCl-Lsg-Injektion [ $F(8,9)=0,516$ ;  $p=0,818$ ].

So lag die gemessene Druckschwelle des linken Kniegelenks bei den Tieren der Gruppe 1 über die gesamte Versuchsdauer diskret und nicht signifikant unter der der Kontrolltiere (s. Abb. 4.1A). Normalisiert auf die Ausgangswerte zeigten sich ähnliche Verläufe (nicht abgebildet).

Auch die Testung des rechten Kniegelenks ergab keine Auffälligkeiten zwischen den Versuchstieren der Gruppe 1 und den Kontrolltieren [ $F(8,9)=2,424$ ;  $p=0,105$ ] (s. Abb. 4.1B).



**Abbildung 4.1:** (A) Mechanische Druckschwelle des linken, injizierten bzw. (B) des rechten, nicht-injizierten Kniegelenkes nach einmaliger Vollblut-Injektion im Vergleich zur Kontrollgruppe (NaCl-Lsg).

VT – Vortestung vor Versuchsbeginn. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM).



### 4.1.2 Sekundäre Hyperalgesie

Es konnte weder die Ausprägung einer mechanischen noch einer thermischen sekundären Hyperalgesie bei einmaliger Vollblut-Injektion festgestellt werden. Auch im Vergleich zur Kontrollgruppe waren keine Effekte erkennbar.

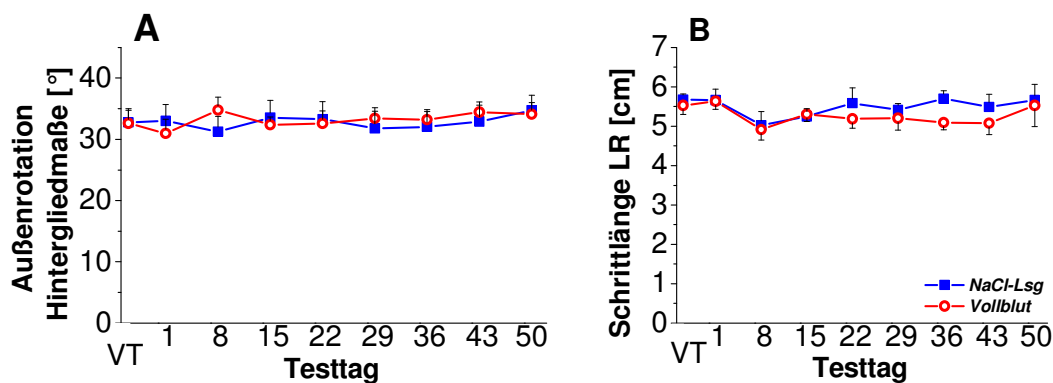
Die Messung der mechanischen Latenz ergab für den Vergleich beider Injektionssubstanzen über die Versuchsdauer für die linke Hinterpfote Werte von  $F(8,9)=2,394$  mit  $p=0,108$  und für die rechte Seite von  $F(8,9)=0,923$  mit  $p=0,540$ .

Für die Hitzelatenz wurden Werte von  $F(8,9)=1,697$  ( $p=0,223$ ) für die linke und  $F(8,9)=1,107$  ( $p=0,438$ ) für die rechte Hinterpfote errechnet.

### 4.1.3 Dynamische Testung durch Bewertung des Gangbildes

Bei der Beurteilung des Gangbildes ergaben sich hinsichtlich der Außenrotation über den Versuchszeitraum betrachtet keine signifikanten Unterschiede zwischen Vollblut- und NaCl-Lsg-Injektion [ $F(8,9)=0,853$ ;  $p=0,583$ ] (s. Abb. 4.2A).

Auch die Schrittlänge LR ließ über die Versuchsdauer keinen signifikanten Effekt der Vollblut-Injektion erkennen [ $F(8,9)=0,415$ ;  $p=0,885$ ] (s. Abb. 4.2B).



**Abbildung 4.2:** (A) Veränderungen bei der Beurteilung des Gangbildes in den Parametern Außenrotation der Hintergliedmaße sowie (B) der Schrittlänge LR (Abstand linke-rechte Hinterpfote) nach einmaliger Vollblut-Injektion und Kontrolle.

VT – Vortestung vor Versuchsbeginn. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM).

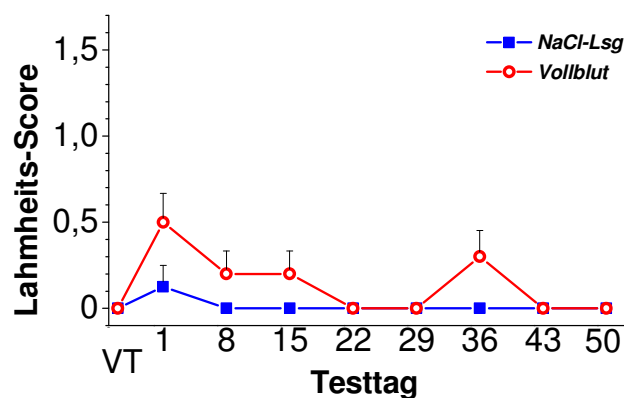
#### 4.1.4 Testung mittels einer Score-Vorgabe

Die Ergebnisse der Beurteilung des Laufverhaltens auf eventuelle Lahmheiten hin sind in Abbildung 4.3 dargestellt.

Tiere der Gruppe 1 zeigten am Tag 1 nach Injektion im Mittel einen Score von 0,5. Dabei wurde bei 5 von 10 Tieren ein Score von 1 (Lahmheit nach Druck aufs Gelenk, s. 3.5.2.5) beobachtet. Am Tag 22 war bei keiner der Ratten mehr eine Lahmheit feststellbar, wobei am Tag 36 nochmals 3 von 10 Tieren einmalig eine Lahmheit erkennen ließen (Score 1).

Bei den Kontrolltieren trat dagegen nur bei einem von 8 Tieren am Tag 1 eine Lahmheit von Score 1 auf (Gruppenmittel 0,125).

Diese geringen Unterschiede zwischen Vollblut- und NaCl-Lsg-Injektion waren über den Versuchszeitraum betrachtet nicht signifikant [ $F(3,14)=2,388$ ;  $p=0,113$ ].



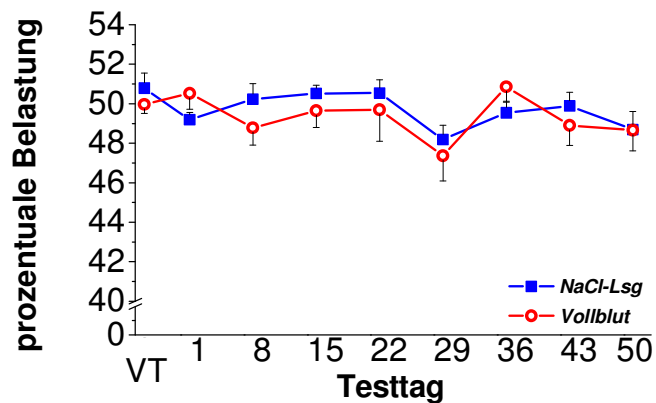
**Abbildung 4.3:** Bewertung von Lahmheiten nach einmaliger Vollblut-Injektion im Vergleich zur Kontrollgruppe (NaCl-Lsg) anhand eines Score-Systems.

VT – Vortestung vor Versuchsbeginn. Mittelwerte +/- Standardfehler (SEM).

### 4.1.5 Statische Testung

Eine Entlastung der injizierten linken Gliedmaße bei einmaliger Vollblut-Injektion konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht festgestellt werden. So ergaben sich für den Vergleich der prozentualen Belastung ( $Bel_{\text{links}}$ ) über den Versuchszeitraum Werte von  $F(8,9)=1,192$  mit  $p=0,397$ .

Wie in Abbildung 4.4 zu erkennen ist, schwankten die gemessenen Werte um den bei physiologischer Belastung zu erwartenden Wert von 50%.



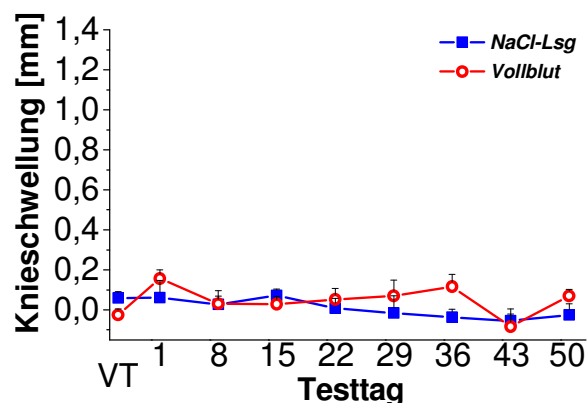
**Abbildung 4.4:** Prozentuale Belastung der linken Hintergliedmaße nach einmaliger Vollblut-Injektion im Vergleich zur Kontrollgruppe (NaCl-Lsg-Injektion).

VT – Vortestung vor Versuchsbeginn. Mittelwerte +/- Standardfehler (SEM).

#### 4.1.6 Klinische Entzündungsanzeichen und allgemeine Morbidität

Klinische Entzündungsanzeichen, gemessen als Schwellung des linken Kniegelenkes (S (Knie<sub>links</sub>)), wurden weder durch die einmalige Injektion von Vollblut noch von NaCl-Lsg hervorgerufen (s. Abb. 4.5). Folglich war auch kein signifikanter Unterschied für S (Knie<sub>links</sub>) über den Versuchszeitraum zu den Kontrolltieren feststellbar [ $F(8,9)=3,073$ ;  $p=0,057$ ].

Da es sich bei S (Knie<sub>links</sub>) um eine rechnerische Größe handelt (s. 3.5.1), konnte es folglich zum Teil zu negativen Werten kommen.



**Abbildung 4.5:** Schwellung des linken, injizierten Kniegelenkes errechnet aus der Differenz der Durchmesser des linken und des rechten Kniegelenkes nach einmaliger Vollblut-Injektion und einmaliger NaCl-Lsg-Injektion (Kontrolle).

VT – Vortestung vor Versuchsbeginn. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM).

Die prozentuale Körpergewichtszunahme als allgemeiner Morbiditätsparameter ließ ebenfalls keinen signifikanten Unterschied über die Zeit nach einmaliger Vollblut-Injektion im Vergleich zur Kontrollgruppe erkennen [ $F(8,9)=0,290$ ;  $p=0,952$ ].

#### 4.1.7 Histologische Befunde

Die histopathologische Bewertung der Kniegelenke ergab weitgehend physiologische Befunde. So waren weder bei den Tieren, die Vollblut injiziert bekamen, noch bei den Kontrolltieren Anzeichen einer akuten Entzündung feststellbar. Auch eine Gelenkdestruktion war nicht erkennbar. Lediglich bei der Erfassung von Anzeichen für eine chronische Entzündung konnte in beiden Gruppen bei jeweils einem Tier ein Punktwert von 0,5 ermittelt werden, der jedoch im Rahmen der physiologischen Streuung liegt ( $\chi^2=0,027$ ;  $p=0,871$ ).

## **4.2 Mehrmalige Injektion von Vollblut (Gruppe 2) und von physiologischer Kochsalzlösung (Kontrollgruppe)**

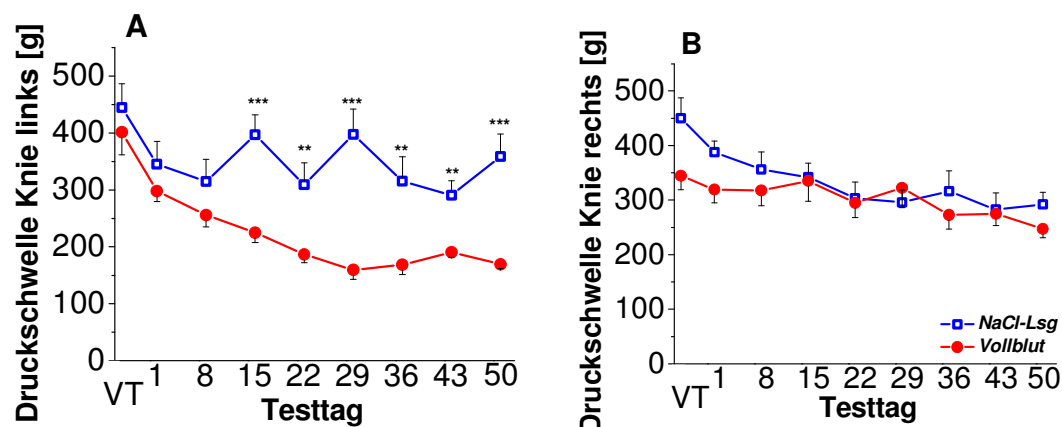
Analog dem Vorgehen bei einmaliger Injektion erfolgte auch zur Bewertung der Effekte einer mehrmaligen Vollblut-Injektion (n=9) ein Vergleich mit einer Kontrollgruppe (mehrmalige NaCl-Lsg-Injektion; n=9).

### 4.2.1 Primäre Hyperalgesie

Bei der Testung der Druckschwelle des linken (injizierten) Kniegelenkes war ein signifikanter Effekt bei mehrmaliger Vollblut-Injektion im Vergleich zur NaCl-Lsg-Injektion über den Testzeitraum zu beobachten [ $F(8,9)=3,386$ ;  $p=0,044$ ].

So lässt Abbildung 4.6A erkennen, dass im Verlauf des am Tag 1 beginnenden Absinkens der Schmerzschwelle in beiden Behandlungsgruppen erstmals am Tag 15, d.h. nach der dritten Injektion, ein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren der Gruppe 2 und der Kontrollgruppe auftrat, der auch über den gesamten Versuchszeitraum bestehen blieb. An den Tagen 29 und 50 zeigten sich die deutlichsten Unterschiede zwischen Vollblut-Injektion und Kontrolle mit mehr als einer Halbierung der Schwellenwerte. So lag die Druckschwelle am Tag 29 bzw. 50 bei den Kontrolltieren im Mittel 2,5 bzw. 2,1 mal höher als bei den Tieren mit Vollblut-Injektionen.

Im Gegensatz dazu blieben die gemessenen Schwellenwerte am rechten, nicht-injizierten Kniegelenk über die Versuchsdauer relativ konstant. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren der Gruppe 2 und den Kontrolltieren beobachtet werden [ $F(8,9)=1,278$ ;  $p=0,359$ ] (s. Abb. 4.6B).



**Abbildung 4.6:** (A) Mechanische Druckschwellen des linken, injizierten bzw. (B) des rechten, nicht-injizierten Kniegelenkes bei mehrmaliger Vollblut-Injektion im Vergleich zur Kontrollgruppe (NaCl-Lsg).

VT – Vortestung vor Versuchsbeginn. Signifikanzniveau: \*  $p < 0,050$ , \*\*  $p < 0,010$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Mittelwerte +/- Standardfehler (SEM).

Somit konnte allein am ipsilateralen (linken, mehrfach injizierten) Kniegelenk ab der dritten Vollblut-Injektion eine primäre Hyperalgesie festgestellt werden.

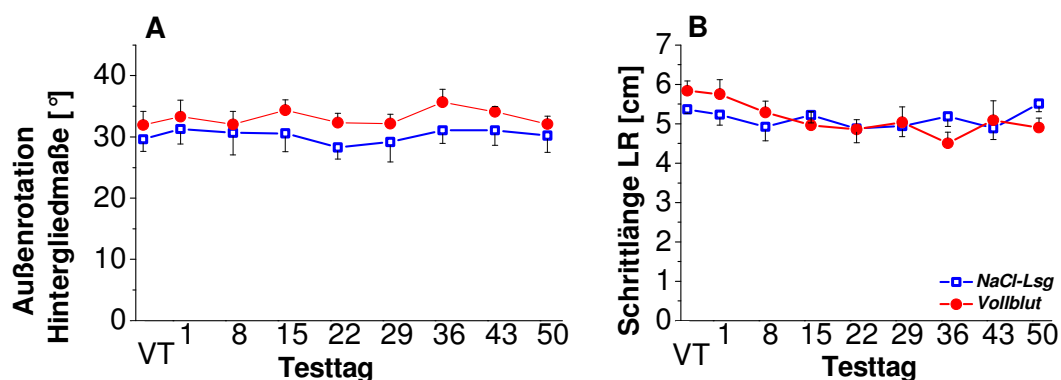
## 4.2.2 Sekundäre Hyperalgesie

Die Ausprägung einer sekundären Hyperalgesie konnte nicht beobachtet werden. So ergab die Testung der mechanischen Latenz an der linken und der rechten Hinterpfote über die Versuchsdauer betrachtet keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe [links:  $F(8,9)=0,438$  ( $p=0,871$ ), rechts:  $F(8,9)=0,521$  ( $p=0,814$ )]. Ebenso verhielt es sich bei der Hitzelatenz-Messung [links:  $F(8,9)=0,478$ ;  $p=0,844$ , rechts:  $F(8,9)=0,422$ ;  $p=0,881$ ].

## 4.2.3 Dynamische Testung durch Bewertung des Gangbildes

Bezüglich der Außenrotation der Hintergliedmaße konnte über die Versuchsdauer kein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren mit mehrmaligen Vollblut-Injektionen und den Kontrolltieren festgestellt werden [ $F(8,9)=0,222$ ;  $p=0,976$ ] (s. Abb. 4.7A).

Die Messung der Schrittlänge LR ließ über den Versuchszeitraum ebenfalls keine signifikanten Unterschiede erkennen [ $F(8,9)=1,843$ ;  $p=0,203$ ] (s. Abb. 4.7B).



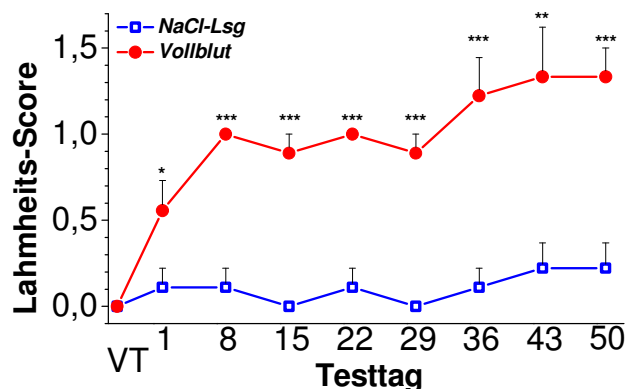
**Abbildung 4.7:** Veränderungen bei der Beurteilung des Gangbildes in den Parametern **(A)** Außenrotation der Hintergliedmaße sowie **(B)** der Schrittlänge LR (Abstand linke-rechte Hinterpfote) bei mehrmaliger Vollblut-Injektion und Kontrolle.

VT – Vortestung vor Versuchsbeginn. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM).

#### 4.2.4 Testung mittels einer Score-Vorgabe

Für die Beurteilung des Laufverhaltens auf Lahmheiten hin ergab sich über die Versuchsdauer ein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren mit mehrmaliger Vollblut-Injektion und der Kontrollgruppe [F(8,9)=27,290;  $p \leq 0,001$ ].

Wie Abbildung 4.8 zeigt, traten zwar auch bei den Kontrolltieren vereinzelt Lahmheiten auf. Allerdings waren dies nur äußerst geringgradige Auffälligkeiten mit einem Score von '1' (Lahmheit nach Druck aufs Gelenk). Bei den Tieren der Gruppe 2 dagegen trat nach der ersten Injektion am Tag 1 bereits bei 5 von 9 Versuchsratten eine Lahmheit auf. Nach der zweiten Injektion (Tag 15) war keines der Tiere mehr lahmheitsfrei. Die Unterschiede zu den Kontrolltieren blieben über den gesamten Versuchszeitraum signifikant. Der höchste beobachtete Score im gesamten Versuch bei mehrmaliger Vollblut-Injektion lag bei '3' mit kompletter Schonung der linken Hintergliedmaße.



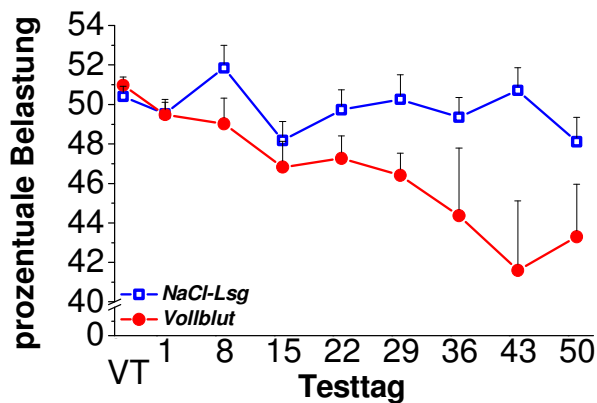
**Abbildung 4.8:** Bewertung von Lahmheiten bei mehrmaliger Vollblut-Injektion im Vergleich zur Kontrollgruppe (NaCl-Lsg) anhand eines Score-Systems.

VT – Vortestung vor Versuchsbeginn. Signifikanzniveau: \*  $p < 0,050$ , \*\*  $p < 0,010$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Mittelwerte +/- Standardfehler (SEM).



### 4.2.5 Statische Testung

Wie Abbildung 4.9 zeigt, waren erste tendenzielle Unterschiede zu den Kontrolltieren in der prozentualen Belastung der linken Hinterextremität ab der zweiten Injektion (Tag 8) zu erkennen. Diese Schonhaltung nahm danach kontinuierlich zu, wobei die stärkste Entlastung der linken Hintergliedmaße bei mehrmaliger Vollblut-Injektion am Tag 43 zu sehen war ( $Bel_{\text{links}} = 41,6\%$ ). Die Werte bei den Kontrolltieren schwankten jeweils um den physiologischen Wert von 50% (Minimum 48,1% (Tag 50), Maximum 51,8% (Tag 8)). Allerdings war über den gesamten Versuchszeitraum betrachtet diese Veränderung nur ein Trend, dem jedoch die statistische Signifikanz fehlte [ $F(8,9)=2,753$ ;  $p=0,076$ ].



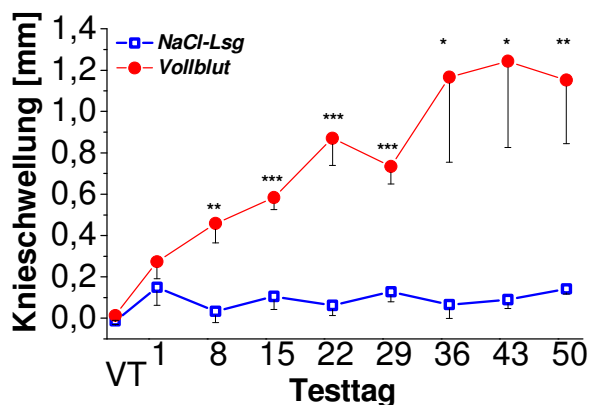
**Abbildung 4.9:** Prozentuale Belastung der linken Hintergliedmaße bei mehrmaliger Vollblut-Injektion im Vergleich zur Kontrollgruppe (NaCl-Lsg-Injektion).

VT – Vortestung vor Versuchsbeginn. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM).

#### 4.2.6 Klinische Entzündungsanzeichen und allgemeine Morbidität

Für die Schwellung als Parameter des Ausmaßes einer klinisch relevanten Entzündung ergab sich im Versuchszeitraum ab Tag 8 ein anhaltend signifikanter Unterschied zwischen mehrmaliger Vollblut-Injektion und Kontrollgruppe mit  $F(8,9)=7,437$  und  $p=0,003$ .

Abbildung 4.10 zeigt den Zeitverlauf der Kniegelenkschwellung in beiden Tiergruppen.



**Abbildung 4.10:** Schwellung des linken injizierten Kniegelenkes errechnet aus der Differenz der Durchmesser des linken und des rechten Kniegelenkes bei mehrmaliger Vollblut-Injektion und mehrmaliger NaCl-Lsg-Injektion (Kontrolle).

VT – Vortestung vor Versuchsbeginn. Signifikanzniveau: \*  $p < 0,050$ , \*\*  $p < 0,010$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Mittelwerte +/- Standardfehler (SEM).

Ein Unterschied in den prozentualen Körpergewichtszunahmen der Tiere der Gruppe 2 im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe war nicht zu beobachten [ $F(8,9)=0,292$ ;  $p=0,952$ ]. Eine mehrmalige intraartikuläre Vollblut-Injektion beeinträchtigte die Tiere in ihrem Allgemeinbefinden also nicht mehr als eine wiederholte intraartikuläre NaCl-Lsg-Injektion.

### **4.3 Mehrmalige Injektionen einzelner Blutbestandteile (Gruppe 3 und 4) im Vergleich zur mehrmaligen Vollblut-Injektion (Gruppe 2) und Kontrollgruppe**

Zur Beurteilung des Effekts einer wiederholten intraartikulären Injektion von Blutplasma (Gruppe 3; n=9) bzw. von zellulären Blutbestandteilen (Gruppe 4; n=9) erfolgte sowohl ein Vergleich der beiden Gruppen untereinander als auch mit der mehrmaligen Vollblut-Injektion (Gruppe 2; n=9). Als Kontrolle dienten wiederum die Tiere mit mehrmaliger NaCl-Lsg-Injektion (n=9).

Für die statistischen Berechnungen (Messwiederholungs-ANOVAs) wurden des Weiteren die Versuchstiere der Gruppe 5 (NaCl-LiHep; n=5) mit einbezogen. Die Ergebnisse der Gruppe 5 werden in 4.4 gesondert mit denen der Kontrollgruppe (Gruppe 2) verglichen und abgebildet und sind daher nicht in den Abbildungen des Kapitels 4.3 berücksichtigt.

Aus den Ergebnissen der Gruppen 1 (einmalige Vollblut-Injektion; s. 4.1) und 2 (mehrmalige Vollblut-Injektion; s. 4.2) wurde gefolgert, dass nur die mehrmalige Injektion von autologem Vollblut geeignet ist, signifikante und reproduzierbare Veränderungen im schmerz-assoziierten Verhalten hervorzurufen.

Folglich wurde für die Versuchsgruppen 3 bis 5 ebenfalls die wöchentliche, insgesamt achtmalige Injektion gewählt (s. 3.3.2.2).

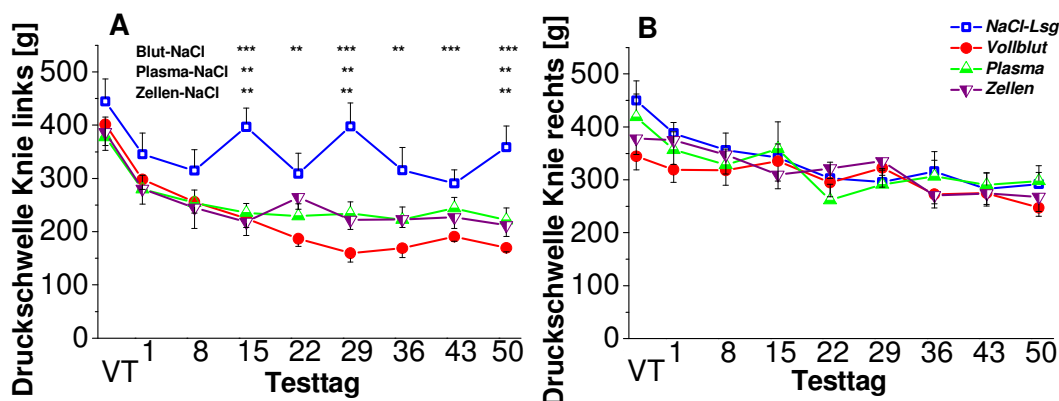
### 4.3.1 Primäre Hyperalgesie

Abbildung 4.11A zeigt, dass auch bei der Injektion von einzelnen Blutbestandteilen die Ausprägung einer primären Hyperalgesie am ipsilateralen (injizierten) Kniegelenk beobachtet werden konnte.

Der Gruppenvergleich ergab über die Versuchsdauer einen signifikanten Effekt von  $F(32,105)=1,736$  mit  $p=0,020$ .

Bei den Versuchsratten, die Blutbestandteile injiziert bekommen hatten, zeigten sich ebenso wie bei denen mit wiederholter Vollblut-Injektion erstmalig nach der dritten Injektion (Tag 15) signifikant niedrigere Druckschwellen als bei den Kontrolltieren. Danach blieben die gemessenen Werte relativ konstant. Das heißt, es konnte im weiteren zeitlichen Verlauf weder eine Verschärfung dieses Unterschiedes noch ein Unterschied in der Wirkung von Blutplasma und von zellulären Blutbestandteilen festgestellt werden (s. Abb. 4.11A).

An der kontralateralen, rechten (nicht-injizierten) Gliedmaße zeigten sich auch bei der Injektion der Blutbestandteile keine signifikanten Gruppen-Zeit-Effekte [ $F(32,105)=0,684$ ;  $p=0,890$ ] (s. Abb. 4.11B).



**Abbildung 4.11:** (A) Mechanische Druckschwellen des linken, injizierten bzw. (B) des rechten, nicht-injizierten Kniegelenkes bei mehrmaliger Injektion von Blutplasma bzw. zellulären Blutbestandteilen im Vergleich zu mehrmaliger Vollblut-Injektion und Kontrollgruppe (NaCl-Lsg).

VT – Vortestung vor Versuchsbeginn. Blut – Vollblut, Zellen – zelluläre Blutbestandteile, Signifikanzniveau: \*  $p < 0,050$ , \*\*  $p < 0,010$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM).

### 4.3.2 Sekundäre Hyperalgesie

Die mehrmalige Injektion einzelner Blutbestandteile führte wie die Vollblut-Injektion weder zur Ausbildung einer sekundären mechanischen noch einer sekundären thermischen Hyperalgesie.

Die Messung der mechanischen Latenzzeit zeigte des Weiteren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen [linke Hinterpfote:  $F(32,105)=1,095$ ;  $p=0,356$ , rechte Hinterpfote:  $F(32,105)=1,028$ ;  $p=0,442$ ].

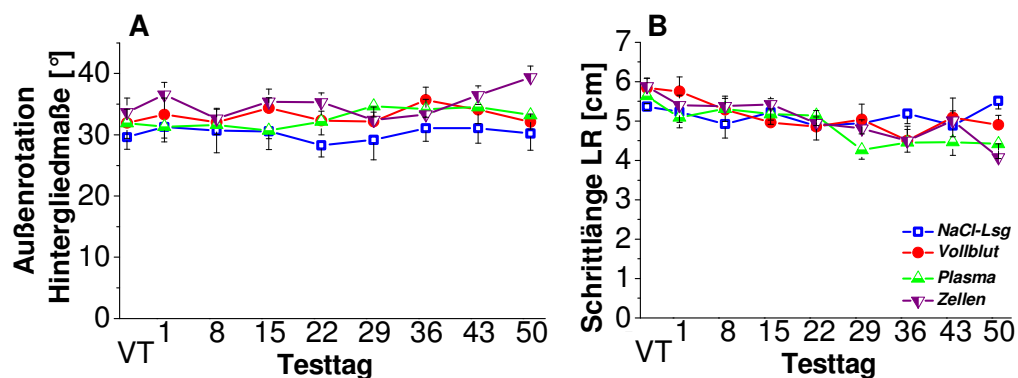
Ebenso verhielt es sich bei den Messergebnissen für die Hitzelatenz [links:  $F(32,105)=0,699$ ;  $p=0,876$ , rechts:  $F(32,105)=1,045$ ;  $p=0,419$ ].

#### 4.3.3 Dynamische Testung durch Bewertung des Gangbildes

Die Bewertung des Gangbildes zeigte zwar bezüglich der Außenrotation der Hintergliedmaße beim Vergleich aller Injektionssubstanzen einen signifikanten Effekt über den Versuchszeitraum mit  $F(32,101)=1,976$  und  $p=0,006$ . In den durchgeführten post-hoc-Tests (s. 3.7) konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen der Wirkung einzelner Blutbestandteile und der von Vollblut festgestellt werden (s. Abb. 4.12A).

Die Messungen der Schrittlänge LR hingegen ergaben keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der Gruppen über den Versuchszeitraum [ $F(32,101)=1,183$ ;  $p=0,261$ ] (s. Abb. 4.12B).

Sowohl bei der Injektion von Vollblut als auch bei der von Blutbestandteilen war lediglich eine Tendenz zur Verkürzung über die Versuchsdauer erkennbar. Diese war bei der Kontrollgruppe nicht zu beobachten.



**Abbildung 4.12:** Veränderungen bei der Beurteilung des Gangbildes in den Parametern (A) Außenrotation der Hintergliedmaße sowie (B) der Schrittlänge LR (Abstand linke-rechte Hinterpfote) bei mehrmaliger Injektion von Blutplasma, zellulären Blutbestandteilen, Vollblut und NaCl-Lsg (Kontrolle).

VT – Vortestung vor Versuchsbeginn. Blut – Vollblut, Zellen – zelluläre Blutbestandteile. Mittelwerte +/- Standardfehler (SEM).

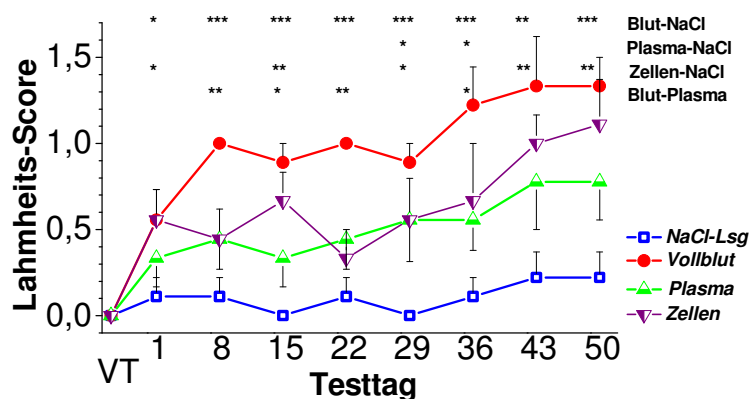
#### 4.3.4 Testung mittels einer Score-Vorgabe

Die Bewertung des Laufverhaltens hinsichtlich Lahmheiten zeigte über den Versuchszeitraum signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen [F(32,105)=2,159; p=0,002]. Nicht nur bei mehrmaliger Vollblut-Injektion, sondern ebenfalls bei der Injektion von Blutplasma und zellulären Bestandteilen waren Lahmheiten im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellbar.

Abbildung 4.13 lässt erkennen, dass die mittleren Lahmheits-Scores bei Blutbestandteil-Injektion während der gesamten Versuchsdauer etwa zwischen denen der Vollblut-Tiere und denen der Kontrolltiere lagen. Vollblut zeigte den deutlichsten Lahmheits-Effekt. So war der Score an bestimmten Testtagen nicht nur gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht, sondern auch gegenüber den Tieren mit einer Injektion von Blutplasma (s. Abb. 4.13).

Die Injektion von zellulären Blutbestandteilen (höchster beobachteter Score '3') schien einen etwas deutlicheren Lahmheits-Effekt zu haben als die Injektion von Blutplasma (höchster beobachteter Score '2'). Dieser Unterschied erwies sich jedoch nicht als statistisch signifikant.

Dagegen konnte bei Injektion zellulärer Blutbestandteile wie bei der von Vollblut bereits am Tag 1 ein signifikant höherer Score als bei der Kontrollgruppe festgestellt werden. Diese Signifikanz blieb jedoch an den nachfolgenden Tagen nicht erhalten, wurde dann aber zum Versuchsende hin (Tag 43, 50) noch deutlicher. Die Injektion von Blutplasma führte lediglich an einzelnen Testtagen (Tag 29, 36) zu signifikanten Lahmheits-Effekten im Vergleich zur NaCl-Lsg-Injektion.



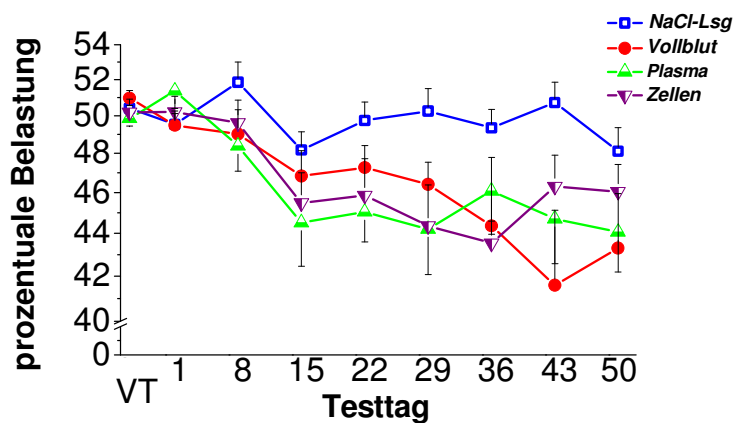
**Abbildung 4.13:** Bewertung von Lahmheiten nach mehrmaliger Injektion von Blutplasma und zellulären Bestandteilen im Vergleich mit mehrmaliger Vollblut-Injektion und Kontrollgruppe (NaCl-Lsg) anhand eines Score-Systems.

VT – Vorstellung vor Versuchsbeginn. Blut – Vollblut, Zellen – zelluläre Blutbestandteile, Signifikanzniveau: \*  $p < 0,050$ , \*\*  $p < 0,010$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Mittelwerte +/- Standardfehler (SEM).

### 4.3.5 Statische Testung

Einzelne Blutbestandteile waren in den Versuchen nicht in der Lage, einen signifikanten Effekt über die Zeit hervorzurufen, weder im Vergleich untereinander, noch zur Vollblut- und NaCl-Lsg-Injektion [ $F(32,105)=1,084$ ;  $p=0,370$ ].

Abbildung 4.14 zeigt, dass sowohl die Injektion einzelner Blutbestandteile als auch die Injektion von Vollblut eine ähnlich starke, jedoch nicht signifikante Entlastung der ipsilateralen Hintergliedmaße im Vergleich zur Kontrollgruppe zur Folge hatte.



**Abbildung 4.14:** Prozentuale Belastung der linken Hintergliedmaße bei mehrmaliger Injektion einzelner Blutbestandteile und bei Vollblut-Injektion im Vergleich zur Kontrollgruppe (NaCl-Lsg-Injektion).

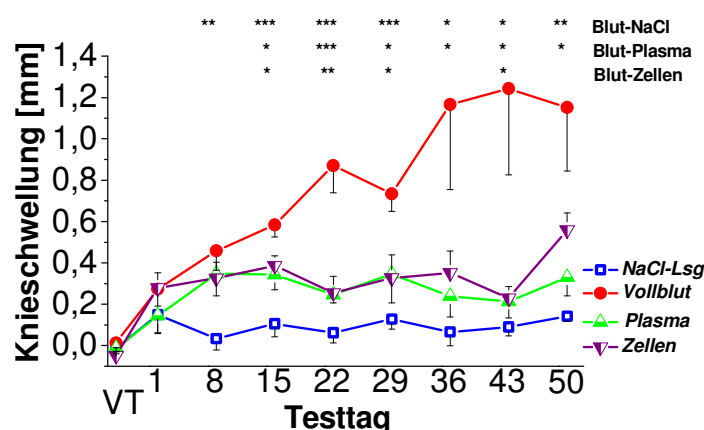
VT – Vortestung vor Versuchsbeginn. Blut – Vollblut, Zellen – zelluläre Blutbestandteile. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM).

### 4.3.6 Entzündungsparameter und allgemeine Morbidität

Die Kniegelenkschwellung zeigte einen signifikanten Effekt beim Vergleich der einzelnen Gruppen über die Zeit [ $F(32,105)=2,304$ ;  $p=0,001$ ].

In Abbildung 4.15 ist zu sehen, dass die Schwellung zunächst bis Tag 8 bei Blutbestandteil-Injektion ähnlich stark zunahm wie bei Vollblut-Injektion. Allerdings blieb die Schwellung ab diesem Versuchszeitpunkt sowohl bei Injektion von Blutplasma als auch von zellulären Blutbestandteilen plateauartig konstant in ihrer Ausprägung. Bei den Tieren mit Vollblut-Injektion nahm sie dagegen noch weiter zu. Statistisch konnte daher ab der dritten Injektion (Tag 15) eine signifikant stärkere Schwellung bei Vollblut-Injektion als bei der von Blutbestandteilen gemessen werden.

Beim Vergleich der Tiere der Gruppen 3 und 4 (Blutbestandteile) mit den Kontrolltieren waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar, obwohl deren Gelenkschwellung zahlenmäßig stets über dem Wert der Kontrollgruppe lag.



**Abbildung 4.15:** Schwellung des linken, injizierten Kniegelenkes errechnet aus der Differenz der Durchmesser des linken und des rechten Kniegelenkes bei mehrmaliger Injektion von einzelnen Blutbestandteilen (Plasma, zelluläre Bestandteile), von Vollblut bzw. von NaCl-Lsg-Injektion (Kontrolle).

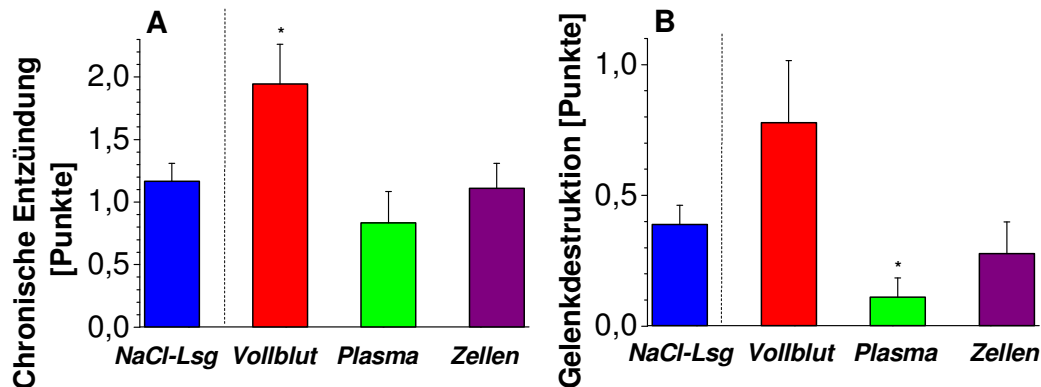
VT – Vortestung vor Versuchsbeginn. Blut – Vollblut, Zellen – zelluläre Blutbestandteile, Signifikanzniveau: \*  $p < 0,050$ , \*\*  $p < 0,010$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM).

Die prozentualen Zunahmen des Körpergewichts zeigten zwar eine signifikante Gruppen-Zeit-Interaktion über die Versuchsdauer [ $F(32,105)=1,578$ ;  $p=0,044$ ]. Jedoch ließen die nicht-signifikanten post-hoc-Tests (s. 3.7) keine Rückschlüsse auf eine erhöhte allgemeine Morbidität der Versuchstiere der Gruppen 3 oder 4 zu.



### 4.3.7 Histologische Befunde und CRP-ELISA

Zur statistischen Analyse der histopathologischen Befunde (s. 3.6.3.2) wurden analog dem Vorgehen bei der Analyse der Ergebnisse der Verhaltenstestungen (s. 4.3) auch die Lithium-Heparin-Injektion mit einbezogen, deren Ergebnisse in 4.4.4 gesondert dargestellt werden.



**Abbildung 4.16:** Ergebnisse der histopathologischen Befundung (Punktesystem) der Schnitte der linken, injizierten Kniegelenke nach mehrmaliger Injektion von Vollblut (n=9), Blutplasma (Plasma; n=9), zellulären Blutbestandteilen (Zellen; n=9) bzw. von NaCl-Lsg (Kontrollgruppe; n=9) hinsichtlich (A) chronischer Entzündung sowie (B) Gelenkdestruktion.

Zellen – zelluläre Blutbestandteile. Signifikanzniveau: \*  $p < 0,050$ ; Signifikanz gegenüber NaCl-Lsg-Injektion. Mittelwerte +/- Standardfehler (SEM).

#### 4.3.7.1 Akute und chronische Entzündungsanzeichen

Anzeichen einer akuten Kniegelenkentzündung waren lediglich bei einem Tier der Gruppe 2 (mehrmalige Vollblut-Injektion; 3 Punkte), sowie bei zwei Tieren der Gruppe 4 (Injektion zellulärer Blutbestandteile; jeweils 1 Punkt) sichtbar. Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Injektionssubstanzen sowie der Kontrollgruppe konnten nicht festgestellt werden ( $\chi^2=4,680$ ;  $p=0,322$ ).

Hinsichtlich der chronischen Entzündungsparameter konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden ( $\chi^2=12,558$ ;  $p=0,014$ ).

Abbildung 4.16A lässt erkennen, dass bei der mehrmaligen Injektion von Vollblut der stärkste Effekt auftrat. Der höchste Einzelwert trat bei Vollblut-Injektion mit 4 Punkten auf, bei den Injektionen der beiden Blutbestandteile lag der höchste beobachtete Einzeltier-Punktwert jeweils bei 2.

Insgesamt zeigten alle Einzeltiere der Gruppe 2 (mehrmalige Vollblut-Injektion) einen pathologischen Befund.

Auch bei der Kontrollgruppe konnten Anzeichen einer chronischen Gelenkentzündung beobachtet werden; der höchste Wert war 1,5.

Darüber hinaus war weder bei den drei Gruppen noch bei den Kontrolltieren eine Entzündung des umliegenden Weichteilgewebes zu erkennen.

#### **4.3.7.2 Gelenkdestruktion**

Der Gruppen-Vergleich ergab für die Gelenkdestruktion einen signifikanten Effekt ( $X^2=13,465$ ;  $p=0,009$ ).

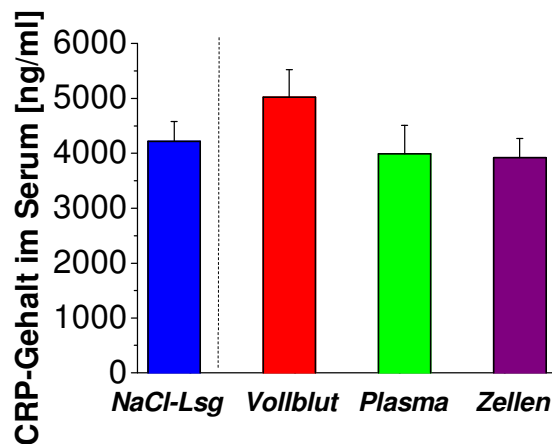
Vollblut zeigte wiederum die stärkste Wirkung (s. Abb. 4.16B). Lediglich in dieser Gruppe konnte eine Destruktion knöcherner Strukturen, die neben den knorpeligen Gelenkanteilen beurteilt wurde, gesehen werden (2 von 9 Tieren). In der Gruppe mit Injektionen zellulärer Bestandteile war die Gelenkdestruktion nur etwa halb so deutlich ausgeprägt. Der direkte Vergleich zur Vollblut-Injektion verfehlte die statistische Signifikanz knapp ( $p=0,053$ ).

Die geringste Destruktion des Kniegelenks war bei den Plasma-injizierten Tieren zu erkennen, was sich in einem signifikant niedrigeren Mittelwert im Vergleich zur Vollblutgruppe widerspiegelte.

Auch hier konnten in der Kontrollgruppe wiederum pathologische Befunde erhoben werden, was zur Folge hatte, dass sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Injektion von Plasma zeigte (s. Abb. 4.16B).

### 4.3.7.3 CRP-ELISA

Die Untersuchung auf den CRP-Gehalt des Serums zeigte keine signifikanten Effekte ( $X^2=3,413$ ;  $p=0,332$ ). Allerdings zeigt Abbildung 4.17, dass bei wiederholter Vollblut-Injektion tendenziell höhere CRP-Gehalte feststellbar waren als bei den anderen Gruppen. So lagen die Werte bei den Tieren, denen einzelne Blutbestandteile injiziert wurden, etwa auf gleichem Niveau wie bei den Kontrolltieren.



**Abbildung 4.17:** Gehalt an C-Reaktivem Protein (CRP) im final entnommenen Serum nach mehrmaliger Injektion von NaCl-Lsg-Injektion (Kontrolle; n=9), Vollblut (n=9), Blutplasma (Plasma; n=9) und zellulären Blutbestandteilen (Zellen; n=9).

Mittelwerte +/- Standardfehler (SEM).

### **4.3.8 Korrelation der histologischen Befunde mit dem schmerz-assoziierten Verhalten**

Zur Ermittlung einer Korrelation von Verhaltenstestung und histologischen Befunden wurden die Tag 50-Werte (letzter Testtag und Entnahme der Gelenke) herangezogen, um auf diese Weise auch zeitlich assoziierte Parameter zueinander in Beziehung setzen zu können.

#### **4.3.8.1 Entzündung und Verhalten**

Die histopathologischen Befunde der chronischen Kniegelenksentzündung zeigten mit den Ergebnissen verschiedener Verhaltenstests am Tag 50 diverse Korrelationen.

So ergab sich für die Kniegelenkschwellung sowohl bei Vollblut- als auch bei zellulärer Bestandteil-Injektion eine deutliche positive Korrelation mit dem Grad der chronischen Gelenksentzündung (Vollblut:  $r=0,765$ ;  $p=0,016$ , Zellen:  $r=0,798$ ;  $p=0,010$ ). Je stärker also die Gelenkschwellung als klinisches Anzeichen einer Entzündung ausgeprägt war, desto massiver war auch histologisch eine Entzündung ausgebildet.

Der Vergleich des Ausmaßes der chronischen Kniegelenksentzündung mit der prozentualen Belastung zeigte bei Vollblut-Injektion eine negative Korrelation ( $r=-0,677$ ;  $p=0,045$ ), bei der Injektion von zellulären Blutbestandteilen ebenfalls ein fast signifikantes Ergebnis ( $r=-0,649$ ;  $p=0,059$ ). Somit ließ sich mit zunehmender chronischer Entzündung eine verminderte Belastung feststellen, was folglich einer Entlastung der linken Gliedmaße entsprach.

Bei der Injektion zellulärer Bestandteile ergab sich zudem eine positive Korrelation zwischen chronischer Entzündung und dem Score ( $r=0,769$ ;  $p=0,015$ ). Das bedeutet, dass einem höheren Score eine stärkere chronische Entzündung zugrunde lag.

Des Weiteren zeigte sich sowohl bei Vollblut- als auch bei Plasma-Injektion eine nahezu signifikante Korrelation zwischen dem histologischen Bild der chronischen Entzündung und dem CRP-Gehalt im final entnommenen Serum (Vollblut:  $r=0,630$ ;  $p=0,069$ , Plasma:  $r=0,645$ ;  $p=0,061$ ). Je höher der Punktwert der Entzündung, desto höher war also der Gehalt an CRP.

#### **4.3.8.2 Gelenkdestruktion und Verhalten**

Für die Vollblut-Injektion zeigten sich wiederum diverse Korrelationen zwischen den histopathologischen Gelenksbefunden und verschiedenen Verhaltensparametern.

So ergab sich für die Kniegelenkschwellung eine deutliche, positive Korrelation mit der Histopathologie ( $r=0,834$ ;  $p=0,005$ ). Dieser Parameter für das Maß einer klinischen Entzündungskomponente nahm also mit dem Ausmaß der Gelenkdestruktion in seiner Ausprägung zu. Die prozentuale Belastung der linken Hintergliedmaße zeigte dagegen eine negative Korrelation mit dem Grad der histopathologischen Gelenkdestruktion, die allerdings knapp den Wert der statistischen Signifikanz verfehlte ( $r=-0,664$ ;  $p=0,051$ ). Dies bedeutet, dass wie bei der Entzündung mit der Schwere der histologischen Befunde eine zunehmende Entlastung der linken Gliedmaße einher geht.

Eine Korrelation der histopathologischen Kniegelenksdestruktion mit dem CRP-Gehalt des Serums konnte lediglich bei der Blutplasma-Gruppe beobachtet werden ( $r=0,738$ ;  $p=0,023$ ).

## 4.4 Einfluss von Lithium-Heparin

Um einen eventuellen Einfluss des Antikoagulans Lithium-Heparin auf das schmerzassoziierte Verhalten zu ergründen, wurden die Ergebnisse der Gruppe 5 (mehrmalige Lithium-Heparin-NaCl-Lsg-Injektion) mit denen der Kontrollgruppe (mehrmalige NaCl-Lsg-Injektion; n=9) verglichen.

Hierfür wurden die Tiere zur statistischen Analyse in die Messwiederholungs-ANOVAs zur Ermittlung von Gruppenunterschieden bei Blutbestandteil-Injektion (s. 4.3) mit einbezogen. Die F-Werte sind daher mit den in Abschnitt 4.3.1 bis 4.3.7 genannten identisch und werden hier nicht noch einmal gesondert aufgeführt. In diesem Kapitel soll stattdessen fokussiert auf die möglichen Folgen der Injektion einer mit Lithium-Heparin angereicherten NaCl-Lsg eingegangen werden.

In die statistischen Berechnungen und in die Abbildungen sind bis einschließlich Tag 29 n=5 Tiere der Gruppe 5 mit einbezogen worden, ab Tag 36 nur noch n=4 Tiere, da ein Tier aus technischen Gründen aus dem Versuch genommen werden musste. Da die Tierzahl von vornherein klein war, sollte auf die bis Tag 29 gewonnenen Werte dieses Tieres nicht verzichtet werden.

### 4.4.1 Primäre und sekundäre Hyperalgesie

Wie in 4.3.1 dargestellt, ergab sich für die Druckschwelle des linken injizierten Kniegelenks ein signifikanter Gruppen-Zeit-Effekt [ $F(32,105)=1,736$ ;  $p=0,020$ ]. Beim Vergleich der Auswirkungen der Lithium-Heparin-Injektion mit der von reiner NaCl-Lsg konnte jedoch kein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Am rechten Kniegelenk zeigten sich beim Vergleich dieser beiden Tiergruppen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

Der Vergleich aller mehrmalig injizierten Gruppen ergab bezüglich der mechanischen und thermischen Latenzzeit keine signifikanten Unterschiede (s. 4.3.2). Folglich ergab sich auch für den hier zu berücksichtigenden Vergleich der Injektion mit NaCl-LiHep und der mit NaCl-Lsg (Kontrollgruppe) bezüglich sekundärer mechanischer und thermischer Hyperalgesie kein unterschiedliches Ergebnis.

### 4.4.2 Motorische Verhaltenstests

Bei Betrachtung der Außenrotation ergab sich, wie in 4.3.3 angeführt, ein signifikanter Gruppen-Zeit-Effekt [ $F(32,101)=1,976$ ;  $p=0,006$ ]. Allerdings konnten für

die Lithium-Heparin-Injektion in den durchgeführten post hoc-Tests keine signifikant abweichenden Ergebnisse errechnet werden.

Die Beurteilung der Schrittlänge LR zeigte ebenfalls keine Auffälligkeiten.

Bei der Bewertung von Lahmheiten mittels einer Score-Vorgabe konnte, wie in Abschnitt 4.3.4 ausgeführt, bei Betrachtung aller Gruppen ein signifikanter Zeit-Effekt ermittelt werden. Greift man Gruppe 5 für den Vergleich mit der Kontrollgruppe heraus, so ergab sich jedoch in den post hoc-Tests kein signifikanter Unterschied.

Auch bei der Belastung der linken Hintergliedmaße konnte kein signifikanter Effekt der Injektion von Lithium-Heparin-haltiger NaCl-Lsg über die Versuchsdauer festgestellt werden (s. 4.3.5). Die Werte schwankten analog zu denen bei Injektion reiner NaCl-Lsg (s. ebd.) um den physiologischen Wert von 50%.

#### **4.4.3 Entzündungsparameter und allgemeine Morbidität**

Die in Abschnitt 4.3.6 erwähnte Signifikanz der Kniegelenkschwellung bei den einzelnen Gruppen über die Zeit konnte in den post hoc-Tests für den hier interessierenden Vergleich der Injektion Lithium-Heparin-haltiger NaCl-Lsg mit der Kontrollgruppe nicht bestätigt werden.

Beim Vergleich der prozentualen Gewichtszunahme aller mehrmalig injizierten Tiere zeigte sich ein Effekt über die Zeit, der gerade noch die statistische Signifikanz erreichte [ $F(32,105)=1,578$ ;  $p=0,044$ ] (s. 4.3.6). Der sich in den post-hoc-Tests ergebende signifikante Unterschied zwischen Gruppe 5 (Lithium-Heparin) und der Kontrollgruppe ist allerdings auf technische Gründe zurückzuführen (s. 5.3).

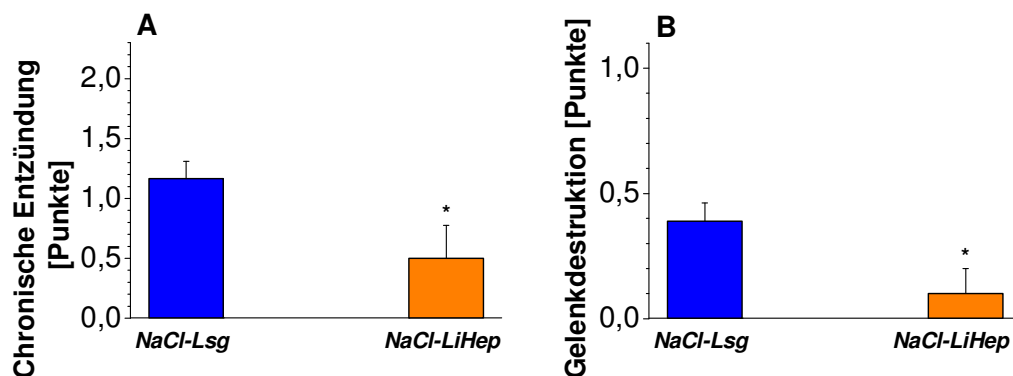
#### **4.4.4 Histologische Befunde**

Wie in 4.3.7 angeführt, erfolgte die statistische Analyse der histopathologischen Befunde nach Injektion Lithium-Heparin-haltiger NaCl-Lsg mittels Messwiederholungs-ANOVAs zusammen mit den Gruppen 2 bis 4 (mehrmalige Injektion von Vollblut, Blutplasma und zellulären Blutbestandteilen) sowie der Kontrollgruppe (mehrmalige Injektion von NaCl-Lsg). Analog dem Vorgehen bei der Interpretation der Verhaltenstestungen soll wiederum fokussiert auf mögliche Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe (reine NaCl-Lsg) eingegangen werden (s. 4.4).

Anzeichen einer akuten Kniegelenksentzündung konnten weder bei der Injektion reiner NaCl-Lsg noch bei der von mit Lithium-Heparin angereicherter NaCl-Lsg entdeckt werden. In beiden Gruppen zeigte sich auch keine Entzündung der umliegenden Weichteilgewebe.

Interessanterweise waren die Merkmale einer chronischen Entzündung bei den Tieren der Lithium-Heparin-Gruppe signifikant weniger als bei den Kontrolltieren ausgeprägt (s. Abb. 4.18A).

Eine milde Gelenkdestruktion war in beiden Gruppen bei einzelnen Tieren feststellbar, wobei nur knorpelige Strukturen betroffen waren (Maximum jeweils 0,5 Punkte). Wie Abbildung 4.18B zeigt, lag jedoch der Mittelwert der Gelenkdestruktion bei Tieren mit NaCl-LiHep-Injektion im Vergleich zur Kontrollgruppe wiederum signifikant niedriger.



**Abbildung 4.18:** Ergebnisse der histopathologischen Bewertung der linken (injizierten) Kniegelenke nach wiederholter Injektion von Lithium-Heparinhaltiger NaCl-Lsg (NaCl-LiHep; n=5) und von reiner NaCl-Lsg (Kontrollgruppe; n=9) für die Parameter **(A)** chronische Entzündung und **(B)** Knorpeldestruktion.

Mittelwerte +/- Standardfehler (SEM), Signifikanzniveau: \*  $p < 0,050$ .

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass sich bei der Injektion von Lithium-Heparin-NaCl-Lsg im Vergleich zu der von reiner NaCl-Lsg zwar eine geringfügig verminderte chronische Entzündung und Destruktion im Kniegelenk zeigte, die Tiere sich jedoch hinsichtlich des schmerz-assoziierten Verhaltens und der motorischen Parameter nicht voneinander unterschieden.



## 5 DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Modell der autologen Blut-Injektion ins Kniegelenk als Modell für Hämophilie-assoziierten Gelenkschmerz validiert werden. Wie die Ergebnisse zeigen, können deutliche Veränderungen des schmerz-assoziierten Verhaltens ebenso wie klinische Entzündungsanzeichen erst durch mehrmalige intraartikuläre Injektionen hervorgerufen werden. Die wiederholte Injektion von autologem Vollblut hatte dabei den stärksten Effekt. Die beobachteten Veränderungen bei den Injektionen von Blutplasma und von zellulären Blutbestandteilen lassen den Schluss zu, dass beide Komponenten wirksam sind aber jeweils nicht den Effekt von Vollblut erreichen.

### 5.1 Einmalige und mehrmalige Vollblut-Injektion

Um die hämophile Arthropathie (HA) von einmaligen, meist traumatischen Blutungsereignissen abgrenzen zu können, wurde zunächst ein Vergleich zweier Injektionsschemata (einmalige versus mehrmalige intraartikuläre Injektion) durchgeführt. Das Ziel dabei war, mit der aufeinanderfolgenden mehrmaligen Injektion deutliche und reproduzierbare Veränderungen im schmerz-assoziierten Verhalten hervorzurufen wie sie auch bei Menschen mit HA auftreten.

#### 5.1.1 Einmalige Vollblut-Injektion

Die einmalige Injektion von autologem Vollblut diene in erster Linie der Imitation einer intraartikulären Blutung wie sie beispielsweise in Folge eines Traumas auch beim nicht-hämophilen Menschen auftreten kann. Es stellte sich die Frage, ob diese bereits zu schmerz-assoziierten Verhaltensveränderungen führen würde und wie sich diese gegebenenfalls hinsichtlich Dauer und Schwere der Veränderungen zur mehrmaligen Injektion abgrenzen lässt.

Zwar sind bereits mehrere in der technischen Ausrichtung ähnliche *in vivo*-Versuche an verschiedenen Tiermodellen durchgeführt worden, allerdings wurden dabei nie schmerz-assoziierte Verhaltensveränderungen erfasst (s. 2.5).

Einem traumatisch bedingten Hämarthros liegt in der Regel eine schwerwiegende intraartikuläre Verletzung zugrunde. Im humanen Kniegelenk ist die in diesem Zusammenhang am häufigsten zu beobachtende Verletzung die Ruptur des vorderen Kreuzbandes (DEHAVEN, 1980; NOYES et al., 1980; HARDAKER et al.,

1990). Als Hinweis auf eine Blutung gilt dabei eine innerhalb von wenigen Stunden auftretende schmerzhafte Gelenkschwellung (HARDAKER et al., 1990; SARIMO et al., 2002).

Eine signifikante Schwellung konnte bei der einmaligen intraartikulären Vollblut-Injektion im Vergleich zur Kontrollgruppe anhand der Mittelwerte am Tag 1 nicht beobachtet werden. Einzelne Tiere zeigten jedoch 24 Stunden nach der Injektion tendenziell eine Schwellung des Kniegelenks (s. 4.1.6).

Im Rahmen dieser Arbeit traten bei der einmaligen Injektion von autologem Vollblut lediglich bei der Verwendung eines Lahmheits-Scores leichte Unterschiede zur Kontrollgruppe auf. Diese erwiesen sich allerdings nicht als statistisch signifikant und manifestierten sich nur vorübergehend (s. 4.1.4). Die anderen in den Verhaltenstestungen gewonnenen Parameter zeigten keine Auffälligkeiten.

Diese tendenziellen Veränderungen im Lahmheits-Score manifestierten sich insbesondere am Tag 1, d. h., 24 Stunden nach der intraartikulären Injektion. Dabei zeigte die Hälfte der Versuchsratten eine Lahmheit von Score 1, also erst nach lateralem Druck aufs Gelenk. Das lässt auf eine gewisse Schmerzhaftigkeit schließen, die allerdings nicht so stark ausgeprägt war, dass sie zu einer primären Hyperalgesie geführt hätte (s. 4.1.1). Dies deckt sich mit Ergebnissen einer caninen *in vivo*-Studie (ROOSENDAAL et al., 1999c), bei der die Tiere bereits eine Stunde nach der Injektion eine annähernd physiologische Belastung zeigten und keine Anzeichen von Schmerz erkennen ließen. Offensichtlich kam es durch eine einmalige intraartikuläre Blutinjektion insbesondere nicht zu Langzeitveränderungen am Gelenk.

Allerdings gab es weder in den Versuchen dieser Dissertation noch im genannten Hunde-Modell ein echtes Gelenkstrauma, das neben der Blutung eine wichtige Ursache des Schmerzes bei einem traumatischen Blutungsereignis im Gelenk darstellen dürfte. Ein weiterer wichtiger Unterschied einer experimentell induzierten Blutansammlung im Gelenk im Vergleich zu einer traumatischen intraartikulären Blutung ist der Unterschied im Blutvolumen. Bei einer natürlich auftretenden Gelenkblutung blutet es solange, bis ein gewisser Druck in der Gelenkhöhle erreicht ist und sich das Gelenk sozusagen selbst tamponiert oder bis es zur Gerinnung kommt. Diese volumenbedingte Erhöhung des intraartikulären Drucks trägt in der Folge zur Entwicklung von Schwellung und Schmerzhaftigkeit bei. Bei der experimentellen Blutinjektion dagegen wird nur ein begrenztes Volumen injiziert, das

an sich offensichtlich keinen Effekt hat, wie auch die volumenidentische Injektion von NaCl-Lsg in dieser Arbeit zeigte.

Die Tatsache, dass sich außer den dargestellten Veränderungen des Lahmheits-Scores keine Auffälligkeiten zeigten, die eventuellen klinischen Symptomen beim Menschen entsprechen würden, stimmt mit der zu beobachtenden Diskrepanz zwischen Klinik und *in vitro*-Versuchen überein. Danach muss ein einmaliges intraartikuläres Blutungsereignis keine klinischen Symptome zur Folge haben. *In vitro* kann dagegen bereits eine einmalige kurze Blutexposition humaner Knorpelzellen in Zellkultur zu schädigenden Effekten führen (ROOSENDAAL et al., 1999b).

In der vorliegenden Untersuchung waren nicht nur die unmittelbaren akuten klinischen Folgen von intraartikulärem Blut von Interesse, sondern auch die davon ausgehenden chronischen Effekte, insbesondere in Form einer histologisch darstellbaren Gelenkdegeneration.

Aus Untersuchungen zu Langzeitfolgen traumatischer Gelenkblutungen bei nicht-hämophilen Menschen ist bekannt, dass langfristig Gelenkschädigungen auftreten können (LOHMANDER & ROOS, 1994). Da Symptome dafür erst viele Jahre später sichtbar werden, ist der Nachweis eines kausalen Zusammenhangs allerdings schwer.

In der Literatur finden sich aus *in vivo*-Studien an Versuchstieren in erster Linie Belege dafür, dass eine solche einmalige Gelenkblutung nur zu vorübergehenden Veränderungen, insbesondere der Synovialmembran führt, ohne dabei den Gelenkknorpel zu beeinflussen (WOLF & MANKIN, 1965; ROY & GHADIALLY, 1966; HOAGLUND, 1967; SAFRAN et al., 1994). Es finden sich aber auch Hinweise, die zwar auf eine transiente Schädigung der Knorpelmatrix hindeuten, die sich aber nicht (NIIBAYASHI et al., 1995) oder nur vorübergehend (TAN et al., 2004) in histologischen Befunden widerspiegeln. Zumindest existieren keine Studien, die eindeutig zeigen, dass eine einzige traumatische Blutung, die nicht zusätzlich mit einer Destabilisierung des Gelenks oder einer Bandruptur einhergeht, eine Gelenkschädigung verursacht (ROOSENDAAL et al., 1999c).

Die These, dass in Verbindung mit einer einmaligen intraartikulären Blutung nur transiente negative Effekte auf das Gelenk sichtbar werden, deckt sich mit den histologischen Befunden dieser Arbeit bei einmaliger Vollblut-Injektion. Pathologische

Veränderungen an Knorpel oder Synovialmembran ließen sich dabei nicht erkennen (s. 4.1.7).

Mehrere *in vitro*-Studien liefern dagegen Hinweise, dass bereits eine einzige Blutung zu irreversiblen Gelenkveränderungen führen kann (ROOSENDAAL et al., 1997; ROOSENDAAL et al., 1999b; TAJIMA et al., 2005; JANSEN et al., 2007).

So zeigte sich in mehreren *in vitro*-Studien (ROOSENDAAL et al., 1997; ROOSENDAAL et al., 1999b; HOOIVELD et al., 2003a; HOOIVELD et al., 2003b; HOOIVELD et al., 2003c), in denen als Teilaspekt der Pathogenese der Blut-induzierten Arthropathie (BIA) die Wirkung von Blut auf Knorpelgewebe untersucht wurde, bereits nach vier Tagen eine deutliche Hemmung der Proteoglycan-Synthese. In Verbindung mit der zusätzlich zu beobachtenden erhöhten Freisetzung von Proteoglycanen (Abbauvorgänge) führte diese Stoffwechselveränderung zu einem verminderten Proteoglycan-Gehalt des Knorpelgewebes (ROOSENDAAL et al., 1997; ROOSENDAAL et al., 1999b; HOOIVELD et al., 2003a; HOOIVELD et al., 2003b; HOOIVELD et al., 2003c). Diese Effekte waren langanhaltend und weitgehend irreversibel, was wahrscheinlich auf das ebenfalls zu beobachtende Absterben der Chondrozyten zurückzuführen ist (ROOSENDAAL et al., 1999b; HOOIVELD et al., 2003b). Die Zeitspanne von vier Tagen entspricht der an Kaninchen *in vivo* beobachteten Eliminationsdauer von Blut aus einem Gelenk (MUIRDEN, 1969; MUIRDEN & PEACE, 1969), die auch aufgrund klinischer Beobachtungen an Hämophilen auf den Menschen übertragen wurde (JANSEN et al., 2007).

Beim Vergleich von Langzeiteffekten zeigte sich allerdings eine Diskrepanz zwischen diesen *in vitro*-Ergebnissen und denen von analogen *in vivo*-Studien. So konnte zwar nach einer kurzzeitigen autologen Vollblut-Exposition eine Veränderung des Knorpelstoffwechsels in einem caninen *in vivo*-Modell festgestellt werden, die mindestens zwei Wochen andauerte (ROOSENDAAL et al., 1999c). Eine dauerhafte Hemmung der Proteoglycan-Synthese konnte aber in Folgeexperimenten (HOOIVELD et al., 2003a) nicht beobachtet werden. Selbst nach einer mehrmaligen Blutinjektion (zwei Mal pro Woche über vier Wochen) konnte zehn Wochen nach der letzten Injektion ein physiologischer Proteoglycan-Gehalt und ein physiologischer Knorpelstoffwechsel ermittelt werden. Diese Beobachtung lässt auf eine gewisse Regenerationsfähigkeit des Gelenkknorpels schließen und deutet auch auf eine

neutralisierende und reparative Aktivität der synovialen Strukturen hin. Letztere Vermutung wird zudem durch die Beobachtung *in vivo* gestützt, dass auch die Kurzzeiteffekte auf den Knorpelstoffwechsel (verminderte Proteoglycansynthese, verstärkter Abbau und Freisetzung von Proteoglycanen) weniger dramatisch als *in vitro* ausfallen (HOOIVELD et al., 2003a).

Diese *in vivo*-Ergebnisse liefern eine mögliche Erklärung für die histologischen Befunde im Rahmen der vorliegenden Arbeit. Die Untersuchung der injizierten Kniegelenke am Versuchsende zeigte dabei weitgehend physiologische Gelenke (s. 4.1.7). Die Gewebeentnahme erfolgte hierbei sieben Wochen nach der einmaligen autologen Vollblut-Injektion. Dieser mehrwöchige Zeitraum war vermutlich ausreichend, um eine Regeneration der zu erwartenden Veränderungen der Knorpelzusammensetzung (NIIBAYASHI et al., 1995) zu ermöglichen. Bei gleichem Injektionsvolumen von autologem nativem Vollblut am gleichen Modelltier (Ratte) konnten die Autoren dieser Arbeit bereits nach einer Woche eine Regeneration des Knorpels feststellen. Die Analyse mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigte eine erhöhte Proteoglycan-Synthese sowie eine Verminderung des zu Beginn zu beobachtenden Proteoglycan-Abbaus. Histologische Ergebnisse hierfür liegen jedoch nicht vor (NIIBAYASHI et al., 1995).

In einem anderen *in vivo*-Versuch mit Blutungsinduktion durch ein stumpfes Trauma bei Faktor VIII-defizienten Mäusen (VALENTINO et al., 2004) konnte selbst bei Entnahme der Gelenke 24 Stunden nach dem Trauma nur ein leicht erweiterter Gelenkspalt, aber keine histologischen Veränderungen an Knorpel oder an synovialen Strukturen festgestellt werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine einmalige intraartikuläre Vollblut-Injektion sowohl kurz- als auch langfristig zu keinen signifikanten schmerzassoziierten Verhaltensveränderungen führt und keine signifikante Störung der Gelenkintegrität zur Folge hat.

### 5.1.2 Mehrmalige Vollblut-Injektionen

Durch mehrmalige intraartikuläre Injektionen von autologem Vollblut sollten bei Ratten schmerz-assoziierte Verhaltensveränderungen hervorgerufen werden, wie sie bei Menschen mit Hämophilie auftreten können. Bereits existierende Tiermodelle sind bisher nicht bezüglich der Ausprägung eines schmerz-assoziierten Verhaltens untersucht worden (s. 2.5), obwohl Schmerzen sowohl in akuter Form bei einer intraartikulären Blutung als auch in chronischer Form bei HA eine große Rolle im täglichen Leben eines Hämophilen spielen können. So gaben in einer Studie zur Lebensqualität bei Hämophilie (ELANDER et al., 2009) 57% der Befragten an, jeden Tag unter Gelenkschmerzen zu leiden, 78% zumindest einmal wöchentlich. Daneben erfolgte im Rahmen dieser Versuche auch eine Untersuchung auf motorische Veränderungen, um eventuelle Bewegungseinschränkungen, wie sie beispielsweise in den USA bei nahezu der Hälfte der Menschen mit schwerer Hämophilie auftreten (SOUCIE et al., 2004), zu erfassen. Das wiederholte Auftreten intraartikulärer Blutungen mit der Spätfolge einer HA ist daher ein bedeutendes klinisches Problem bei Hämophilie, das die Lebensqualität der betroffenen Menschen stark beeinträchtigt (RAFFINI & MANNO, 2007).

Die wiederholte intraartikuläre Injektion von autologem Vollblut beim Versuchstier kann aus verschiedenen Gründen als experimentelles Modell für eine Blutungs-induzierte Arthropathie angesehen werden.

Zunächst entspricht eine wiederholte Blutapplikation am ehesten der klinischen Situation bei Hämophilie und deren Symptomatik. Dies wird unterstützt durch Ergebnisse dieser Arbeit, die zeigen, dass weder schmerz-assoziierte Verhaltensveränderungen noch histologische Charakteristika einer Gelenkdegeneration durch die einmalige Injektion von autologem Vollblut hervorzurufen waren (s. 5.1.1). Außerdem gibt es Belege dafür, dass sich die HA beim Hämophilen auch erst nach wiederholten intraartikulären Blutungen entwickelt (HOAGLUND, 1967; ARNOLD & HILGARTNER, 1977; RODRIGUEZ-MERCHAN, 1999). So wird der Pettersson-Score (zur Bewertung röntgenologisch darstellbarer Veränderungen bei HA (PETTERSSON et al., 1980)), erst durch sechs bis sieben Einblutungen ins Gelenk um einen Punkt angehoben (Skala von 1-13) (FISCHER et al., 2002).

In Ergänzung hierzu konnte in tierexperimentellen *in vivo*-Studien gezeigt werden, dass eine wiederholte Blutexposition zu Gelenkveränderungen führt, die

morphologisch denen einer HA (HOAGLUND, 1967; MADHOK et al., 1988) bzw. einer hämophilen Synovitis (ROY & GHADIALLY, 1966; MEJIA-CARVAJAL et al., 2008) ähneln. In älteren Studien waren vermutlich aufgrund einer zu geringen Blutmenge und zu kurzen Einwirkungsdauer (HOAGLUND, 1967) lediglich Veränderungen der synovialen Strukturen erkennbar gewesen (KEY, 1929; SOEUR, 1949; YOUNG & HUDACEK, 1954; WOLF & MANKIN, 1965).

Ein ganz wesentliches Ergebnis der mehrmaligen autologen Vollblut-Injektion in der vorgelegten Arbeit ist die deutliche Ausbildung einer primären Hyperalgesie (s. 4.2.1) am ipsilateralen (injizierten) Kniegelenk ab der dritten Injektion.

Diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen einer aktuellen Humanstudie (HILBERG et al., 2011), die besagen, dass Hämophile am Kniegelenk eine signifikant niedrigere Druckschmerzschwelle aufweisen als Personen einer nicht-hämophilen Vergleichsgruppe. So lag die gemessene Schmerzschwelle der Hämophilen nur halb so hoch wie die der gesunden Population. Hiermit deckt sich die Beobachtung, dass sich bei Tieren, denen wiederholt Vollblut injiziert wurde, ebenfalls ein Unterschied in dieser Größenordnung im Vergleich zur Kontrollgruppe ergab (s. 4.2.1). In diesem Teilaspekt ist es somit gelungen, ein der klinischen Situation sehr ähnliches Modell zu schaffen.

Des Weiteren konnte bei mehrmaliger Vollblut-Injektion eine Entzündungssituation mit deutlicher Schwellung des linken Kniegelenkes geschaffen werden, die ab Tag 8, also nach der zweiten Injektion, gegenüber der Kontrollgruppe statistisch signifikant war (s. 4.2.6).

In einer caninen *in vivo*-Studie (HOAGLUND, 1967) war in den ersten zwei Wochen nur eine minimale Gelenkschwellung feststellbar. Maximale Werte wurden zwischen der vierten und sechsten Woche erreicht, danach konnte keine weitere Zunahme mehr festgestellt werden. Diese Befunde spiegeln sich in gewisser Weise in den hier erarbeiteten Ergebnissen wieder. So konnte an den Ratten-Kniegelenken zunächst ebenfalls nur eine leichte Schwellung beobachtet werden. Mit der Zahl der Injektionen nahm diese zu und erreichte den größten Wert am Tag 43 (nach der siebten Injektion). Weitere Veränderungen konnten bis zum Versuchsende nicht mehr festgestellt werden (s. 4.2.6). Maximale Gelenkschwellungen wurden an den Ratten also etwas später gesehen, was vermutlich auf eine weniger starke

Blutexposition des Kniegelenkes als in der genannten caninen *in vivo*-Studie (HOAGLUND, 1967) (sechs Injektionen pro Woche über 12 bis 18 Wochen) zurückzuführen ist.

In einer weiteren *in vivo*-Studie an Faktor VIII-defizienten Mäusen (VALENTINO et al., 2004), bei denen durch ein stumpfes Trauma eine Blutung des Kniegelenkes ausgelöst wurde, zeigte sich ebenfalls eine Schwellung des ipsilateralen Kniegelenkes. Auch hier war einen Tag nach dem ersten Blutungsereignis nur eine leichte Schwellung messbar, die sich durch eine zweite Blutung steigern ließ und ihr Maximum drei Tage danach erreichte. Die Autoren führten die Schwellung dabei auf eine Kombination aus Volumenzunahme der Gelenksflüssigkeit durch die akute Blutung und aus der sich durch das intraartikuläre Blut ausgelösten Entzündungsreaktion zurück, was die kontinuierliche Zunahme der Schwellung bis auf das Maximum am dritten Tag *post injectionem* erklären würde und auch mit den histologischen Befunden dieser Studie (synoviale Hyperplasie) übereinstimmt.

Die in dieser Dissertation beobachtete Schwellung des Kniegelenkes entspricht auch den klinischen Symptomen einer akuten Blutung beim Hämophilen (ARNOLD & HILGARTNER, 1977; RODRIGUEZ-MERCHAN, 1999; PABINGER-FASCHING, 2004; LECHNER & PABINGER-FASCHING, 2007). Eine Gelenkschwellung kann klinisch ebenfalls bei einer Synovitis in Erscheinung treten, die sich in der Regel nach wenigen Blutungen ausbildet (RODRIGUEZ-MERCHAN, 1996, 1997). Das heißt, auch in dem vorliegenden Tiermodell können sich im Erscheinungsbild der Gelenkschwellung die Effekte akuter Blutungen und einer Synovitis addieren. Dafür spricht, dass zumindest chronische Entzündungsanzeichen bei wiederholter Vollblut-Injektion auch histologisch feststellbar waren (s. 4.3.7.1).

Die akute Blutung ins Gelenk ist beim Menschen mit Hämophilie klinisch neben der beschriebenen Schwellung auch mit deutlicher Schmerzhaftigkeit des Gelenks assoziiert. Dafür sprechen die oftmals daraus resultierende Schonhaltung des Gelenks in Flexion und die deutlichen Bewegungseinschränkungen (ARNOLD & HILGARTNER, 1977; RODRIGUEZ-MERCHAN, 1999; PABINGER-FASCHING, 2004; LECHNER & PABINGER-FASCHING, 2007).

Vor diesem Hintergrund wurde deshalb im Rahmen dieser Arbeit auch das motorische Verhalten der Versuchstiere erfasst.

So konnte das signifikante Auftreten von Lahmheiten mittels eines spezifischen Score-Systems gezeigt werden (s. 4.2.4). Bereits nach der ersten Vollblut-Injektion



(Tag 1) ergab sich ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe. Die Hälfte der Versuchsratten ließ eine Lahmheit nach Druck aufs Gelenk erkennen.

Ebenso konnte bei der Beurteilung deren Gangbildes eine tendenzielle Verkürzung der Schrittlänge LR festgestellt werden (s. 4.2.3). Auch beim Hämophilen können sich strukturelle Gelenkveränderungen bei einer HA in veränderten Gangmustern niederschlagen (BUZZARD, 1998). Allerdings ist die Gelenkdestruktion meist schon weit fortgeschritten bis solche Veränderungen klinisch manifest werden (JORGE FILHO et al., 2006). Diese Tatsache liefert eine mögliche Erklärung dafür, dass bei der mehrmaligen Vollblut-Injektion keine signifikanten Veränderungen bei der Gangbildanalyse gesehen werden konnten. Vermutlich wäre eine längere Versuchsdauer und eine damit einhergehende stärkere Gelenkdestruktion vonnöten gewesen. Geringgradige Veränderungen können auch in der Humanmedizin nur mit modernen Analyse-Apparaturen wie dem GAITRite® walkway festgestellt werden (BILNEY et al., 2003). Bei einer Validierung dieses Gerätes an Menschen mit Hämophilie konnten frühe Gangveränderungen festgestellt werden, bevor diese klinisch manifest wurden (BLADEN et al., 2007). Dabei war interessanterweise, wie in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, eine Verkürzung der Schrittlänge feststellbar.

Ein Befund, der kürzlich bei Menschen mit Hämophilie beschrieben wurde, ist zudem ein eingeschränkter Bewegungsradius (Flexion, Extension, Pronation, Supination etc.) der von Einblutungen betroffenen Gelenke (HILBERG et al., 2011).

Als Maß für eine mögliche schmerzbedingte Schonhaltung der Hinterextremität bei den Versuchstieren, wurde die prozentuale Belastung der linken injizierten Hintergliedmaße mit Hilfe des Incapacitance-Testers gemessen. Dabei war eine Abnahme in der Belastung der linken Hintergliedmaße erkennbar, die zwar die statistische Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe verfehlte, aber dennoch ab der dritten Injektion einen mit der Anzahl der Injektionen zunehmenden, kontinuierlichen Trend zur Entlastung erkennen ließ (s. 4.2.5).

Eine Untersuchung zu motorischen Defiziten im Anschluss an eine traumatisch ausgelöste Gelenkblutung im etablierten Modell der Faktor VIII-defizienten Maus (s. 2.5) mittels eines Laufrades (RotaRod®) (MEJIA-CARVAJAL et al., 2008) erbrachte ähnliche Ergebnisse. Dabei konnte nach der zweiten Blutung ein signifikant

schlechteres Abschneiden der Versuchstiere im Vergleich zu einer Kontrollgruppe gesehen werden. Es konnte auch ein direkter Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer Synovitis und der Beeinträchtigung der motorischen Fähigkeiten festgestellt werden.

Die histopathologische Untersuchung ergab eine gegenüber den Kontrolltieren signifikant ausgeprägte chronische Gelenkentzündung bei wiederholter Vollblut-Injektion (s. 4.3.7.1). Eine leichte Destruktion des Gelenks konnte ebenfalls festgestellt werden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe fehlte dieser allerdings die statistische Signifikanz (s. 4.3.7.2).

Insgesamt gesehen waren die in der vorliegenden Untersuchung feststellbaren histologischen Veränderungen generell sehr mild ausgeprägt.

Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen einer Studie an Kaninchen (MADHOK et al., 1988), bei der bei dreimaliger intraartikulärer Blut-Injektion pro Woche nach acht Wochen, ähnlich unserem Versuch, ebenfalls nur milde bis moderate Knorpelveränderungen sowie mittelgradige entzündliche Veränderungen der Synovialmembran feststellbar waren. Schwerwiegendere Veränderungen des Gelenkknorpels konnten erst nach Weiterführung dieses Injektionsschemas über vier Monate gesehen werden. Die synovialen Befunde blieben jedoch auch dann weitgehend unverändert. Auch im Faktor VIII-Knock out-Mausmodell (VALENTINO et al., 2004) konnte nach zwei Wochen (Blutungsinduktion durch stumpfes Kniegelenkstrauma Tag 0 und Tag 7) eine synoviale Hyperplasie und eine Knorpeldestruktion festgestellt werden.

Beim Menschen mit Hämophilie kommt es ebenfalls bereits nach einer kleinen Anzahl von Blutungen zu einer chronischen Synovitis (RODRIGUEZ-MERCHAN, 1996) und in deren Verlauf zu einer Knorpeldestruktion, die letztendlich zur HA, einer speziellen Form der Arthrose, führt (RODRIGUEZ-MERCHAN & RIBBANS, 1997). Diese ist durch radiologisch sichtbare Knorpelveränderungen gekennzeichnet, wobei auch subchondrale Knochenanteile mitbetroffen sein können (STOKER & MURRAY, 1974; RIPPEY et al., 1978; RODRIGUEZ-MERCHAN, 1998, 1999).

Somit ähneln die Befunde der chronischen Entzündung bei wiederholter Vollblut-Injektion an der Ratte den klinisch beim Menschen bereits frühzeitig feststellbaren Veränderungen einer Synovitis. Die im Unterschied zum Spätstadium einer HA nur mild ausgeprägte Gelenkdestruktion erklärt sich durch die im Vergleich zur

Blutungshistorie eines Hämophilen relativ kurze Versuchsdauer. Degenerative Veränderungen sind dabei beim Hämophilen frühestens nach einer sechs Monate andauernden chronischen Synovitis zu erwarten (ARNOLD & HILGARTNER, 1977).

Es konnte zudem ein Zusammenhang zwischen den histologischen Befunden und bedeutenden Verhaltensparametern festgestellt werden (s. 4.3.8).

So korrelierte sowohl die histologisch erkennbare, chronische Entzündung als auch die Gelenkdestruktion mit der Gelenkschwellung. Zudem konnte eine mit der Schwere der chronischen Entzündung zunehmende Entlastung der injizierten Gliedmaße festgestellt werden. Ebenfalls als nahezu statistisch signifikant erwies sich die Korrelation zwischen Entlastung der linken Hintergliedmaße und der histologisch erkennbaren Gelenkdestruktion.

All diese Beobachtungen zeigen, dass die in diesem Versuch angewendeten Verhaltenstests zur Feststellung von schmerz-assoziierten Veränderungen in wichtigen Parametern mit den zugrunde liegenden histopathologischen Befunden korrelieren.

Zur Beurteilung der Validität der gewonnenen Ergebnisse der Verhaltenstestung kann zudem ein Vergleich mit dem etablierten Modell der Antigen-induzierten Arthritis (AIA) der Ratte (GRIFFITHS, 1992) gezogen werden. Bei der AIA handelt es sich um eine experimentell auslösbare Gelenksentzündung, die der rheumatoiden Arthritis des Menschen in vielen Belangen ähnelt. Zu diesem Modell wurden bereits umfangreiche Verhaltensstudien am Institut für Physiologie des Universitätsklinikums Jena mit denselben Geräten durchgeführt (BOETTGER et al., 2008; BOETTGER et al., 2009; SEGOND VON BANCHET et al., 2009; BOETTGER et al., 2010a; BOETTGER et al., 2010b; LEUCHTWEIS et al., 2010; SCHAIBLE et al., 2010).

Dieser Vergleich ist auch vom klinischen Standpunkt aus betrachtet relevant, da die HA neben Charakteristika degenerativer Arthropathien (Arthrose) auch solche entzündlicher Arthropathien (rheumatoide Arthritis), wie der AIA aufweist. Die degenerativen Knorpelveränderungen entsprechen dabei sowohl histo- als auch biochemisch dem Bild einer Arthrose. Die entzündlichen Veränderungen der Synovialmembran weisen dagegen Kennzeichen einer rheumatoiden Arthritis auf (ROOSENDAAL et al., 1999a), wobei diese inflammatorische Komponente bei der HA vergleichsweise mild ausgeprägt ist (ROOSENDAAL & LAFEBER, 2006).

Insgesamt sind die Veränderungen in den Verhaltenstestungen bei der AIA, insbesondere in der Akutphase, deutlicher ausgeprägt als bei der wiederholten Vollblut-Injektion. Dies entspricht dem Unterschied in der Pathogenese der beiden Arthropathien. Der HA liegt eine wesentlich längere Krankheitsdauer zugrunde, da erste Blutungen typischerweise im Kleinkindalter auftreten, wenn die Kinder zu laufen beginnen (ROOSENDAAL et al., 1999a; LECHNER & PABINGER-FASCHING, 2007). Obwohl eine rheumatoide Arthritis erst wesentlich später im Leben eines Menschen ihren Anfang nimmt, ist jedoch das Alter, in dem das Endstadium (mit der Konsequenz einer arthroplastischen Operation mit Gelenkersatz) erreicht ist, bei beiden Arthropathien ähnlich (ROOSENDAAL et al., 1999a).

Daraus kann man den Schluss ziehen, dass bei einer rheumatoiden Arthritis wesentlich massivere Prozesse in kürzerer Zeit ablaufen, wohingegen die Ausprägung einer HA ein langsamer Prozess ist. Somit entspricht die Differenzierung in den Verhaltenstests dem klinischen Erscheinungsbild.

Bei der AIA kann ebenfalls die Ausprägung einer primären Hyperalgesie festgestellt werden, wobei die gemessenen Druckschmerzschwellen insbesondere in der Akutphase noch niedriger liegen als bei der mehrmaligen Vollblut-Injektion. Die in der chronischen Phase der AIA gemessenen Schmerzschwellen liegen dann auf einem ähnlichen Niveau wie in den Versuchen dieser Dissertation (BOETTGER et al., 2009; SEGOND VON BANCHET et al., 2009; BOETTGER et al., 2010a; BOETTGER et al., 2010b; LEUCHTWEIS et al., 2010). Um eine derartige Hyperalgesie hervorzurufen, waren allerdings mehrmalige Vollblut-Injektionen erforderlich, was nochmals den chronischen Charakter der HA hervorhebt.

Ebenso verhielt es sich mit den anderen beobachteten Veränderungen der Kniegelenkschwellung und der prozentualen Belastung der linken Hintergliedmaße. Die AIA-Tiere zeigen eine wesentlich stärkere Schwellung in der Akutphase. Am Übergang in die chronische Phase werden dann Werte erreicht, die wiederum erst bei mehrmaliger Vollblut-Injektion feststellbar waren (BOETTGER et al., 2009; SEGOND VON BANCHET et al., 2009; BOETTGER et al., 2010a; BOETTGER et al., 2010b; LEUCHTWEIS et al., 2010). Auch die Entlastung der ipsilateralen Gliedmaße stellt sich bei der akuten AIA deutlicher dar. In der chronischen Phase zeigen die Tiere dann aber eine höhere Belastung der betroffenen Gliedmaße als bei mehrmaliger Vollblut-Injektion (BOETTGER et al., 2010a; BOETTGER et al., 2010b; LEUCHTWEIS et al., 2010).

Auf die Motorik hat die AIA in der Akutphase ebenfalls einen deutlicheren Einfluss als die mehrmalige Vollblut-Injektion (BOETTGER et al., 2009; BOETTGER et al., 2010a). Zum einen zeigen die Tiere bis zum Übergang in die akute Phase eine stärker ausgeprägte Lahmheit. Zum anderen tritt in der akuten Phase eine Verkürzung der Schrittlänge und eine Zunahme der Außenrotation auf. Die Verkürzung der Schrittlänge korreliert dabei mit der ebenfalls in der akuten Phase zu beobachtenden sekundären Hyperalgesie.

Da bei der mehrmaligen Injektion von autologem Vollblut keine sekundäre Hyperalgesie gesehen werden konnte, erscheint es aufgrund dieser Erkenntnisse in der Konsequenz plausibel, dass auch keine signifikanten Veränderungen bei der Gangbildanalyse festgestellt werden konnten.

Analog der weniger deutlich ausgeprägten schmerz-assoziierten Verhaltensveränderungen im Vergleich zur AIA zeigen auch die histopathologischen Befunde bei mehrmaliger Vollblut-Injektion nach 50 Tagen eine schwächere Ausprägung als bei der AIA nach 21 Tagen. Bezüglich der chronischen Entzündung (BOETTGER et al., 2010a; BOETTGER et al., 2010b) ist der Unterschied weniger deutlich ausgeprägt als bei der Gelenkdestruktion (BOETTGER et al., 2009; BOETTGER et al., 2010a; BOETTGER et al., 2010b). Dies entspricht der Klinik der HA, bei der zunächst eine Synovitis entsteht, aus der dann die HA hervorgeht. Die nur leicht ausgeprägte Gelenkdestruktion im Rahmen dieses Versuchs lässt darauf schließen, dass ein Frühstadium der HA hervorgerufen werden konnte. Um eine fortgeschrittene Degeneration hervorzurufen, wäre vermutlich eine länger andauernde Blutinjektion vonnöten, wie sie der Pathophysiologie der HA beim Hämophilen entsprechen würde.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es mit dem Schema der mehrmaligen Vollblut-Injektion im Rahmen der Versuche dieser Arbeit erstmalig gelungen ist, ein Tiermodell für Schmerz bei der HA zu etablieren.

## 5.2 Vergleich der Blutbestandteil-Injektion versus der Vollblut-Injektion

Um die Auswirkung einzelner Blutbestandteile auf das schmerz-assoziierte Verhalten zu untersuchen, wurde die wiederholte Injektion von Blutplasma bzw. zellulären Blutbestandteilen mit den Ergebnissen der mehrmaligen Vollblut-Injektion verglichen. Generell ist der Aspekt der Bedeutung einzelner Blutbestandteile für die Entstehung einer HA bisher fast ausschließlich *in vitro* untersucht worden. Daher können die Ergebnisse aus dem Versuchsansatz dieser Arbeit möglicherweise zum besseren Verständnis der Pathogenese der HA *in vivo* beitragen.

JANSEN et al. (2008b) sehen ebenfalls noch großen Forschungsbedarf: „it has to be proven that the proposed mechanism of blood-induced joint damage based on *in vitro* findings also takes place *in vivo* and in humans“.

Die Fraktion der zellulären Bestandteile setzt sich zusammen aus Erythrozyten, Leukozyten (Monozyten, Lymphozyten, Granulozyten) und Thrombozyten (GASSMANN & LUTZ, 2005b). Blutplasma enthält neben etwa 90% Wasser in erster Linie Plasmaproteine, wie Albumin, Fibrinogen, Gerinnungsfaktoren, verschiedene Globuline und Enzyme. Daneben kommen u.a. Elektrolyte, Nicht-Protein-Stickstoff-Verbindungen (z.B. Harnstoff), Lipide und Kohlenhydrate im Plasma vor (GASSMANN & LUTZ, 2005a). Wie in Abschnitt 2.3 genauer ausgeführt, wird in der Pathogenese der HA insbesondere den Erythrozyten aufgrund des beim Hämoglobin-Abbaus anfallenden Hämosiderins und Eisens große Bedeutung zugeschrieben. Vermutlich spielen auch die von Monozyten bzw. Makrophagen gebildeten Zytokine eine wichtige Rolle.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die mehrmalige Vollblut-Injektion den stärksten Effekt auf das schmerz-assoziierte Verhalten hat. Blutplasma und zelluläre Blutbestandteile wirken dabei offensichtlich additiv. Demnach scheinen zur experimentell induzierten Ausbildung eines HA-typischen Schmerzzustandes im Gelenk beide Bestandteile nötig zu sein, um zur Pathophysiologie beizutragen.

Besonders deutlich wurde dieser Unterschied beim Auftreten klinischer Entzündungsanzeichen (Kniegelenkschwellung) (s. 4.3.6). Ab Tag 15 (nach der dritten Injektion) war die Schwellung in der Vollblut-Gruppe signifikant stärker

ausgeprägt als bei der alleinigen Injektion von zellulären Bestandteilen und von Blutplasma (bis auf zwei Ausnahmen an einzelnen Testtagen).

Auch bei der induzierten Ausbildung einer primären Hyperalgesie hatte Vollblut den stärksten Effekt, wobei sich die Unterschiede im Vergleich zu den einzelnen Bestandteilen nicht als statistisch signifikant erwiesen (s. 4.3.1).

Bei der Gangbeurteilung mittels eines Lahmheits-Scores konnte sowohl bei der Injektion von Blutplasma als auch bei der von zellulären Bestandteilen an einzelnen Tagen ein signifikanter Effekt im Vergleich zur Kontrollgruppe gesehen werden; eine Signifikanz der Veränderung über die gesamte Versuchsdauer konnte aber nur durch die Injektion von Vollblut hervorgerufen werden. Der Effekt der Vollblut-Injektion war dabei zu bestimmten Testzeitpunkten signifikant stärker als bei Blutplasma (s. 4.3.4).

Lediglich bei der Entlastung der linken, injizierten Hintergliedmaße zeigten die beiden einzeln applizierten Blutbestandteile einen Effekt, der weitgehend dem von Vollblut entsprach (s. 4.3.5). Dieser Parameter ließ zwar einen Trend für einen Effekt von Vollblut bzw. einzelner Bestandteile erkennen, verfehlte insgesamt jedoch die statistische Signifikanz knapp.

Bemerkenswert ist außerdem, dass beide getesteten Blutbestandteile, also Blutplasma und zelluläre Bestandteile, in allen durchgeführten Verhaltenstests einen recht ähnlich starken Effekt bei mehrmaliger Injektion hervorriefen. Auf das Auftreten von Lahmheiten (Score) (s. 4.3.4) sowie auf die Entwicklung einer primären Hyperalgesie des ipsilateralen Kniegelenkes (s. 4.3.1) schienen sowohl das Blutplasma als auch die zellulären Blutbestandteile eine Wirkung zu haben, die in ihrem Effekt etwa der Hälfte der von Vollblut entsprach. Daraus kann gefolgert werden, dass sich die Einzelwirkungen von Blutplasma und von zellulären Bestandteilen in ihrer Wirkung im Vollblut ergänzen.

Die Ergebnisse sind nicht direkt auf die Erkenntnisse von *in vitro*-Studien zur Bedeutung einzelner Blutbestandteile übertragbar, da sich letztere auf die Darstellung von Effekten auf Knorpelzellen und deren Stoffwechsel beschränken. Allgemein haben die Aussagen solcher *in vitro*-Studien eine Limitierung, da zum einen die Rolle der Synovialmembran unberücksichtigt bleibt, die ebenfalls eine wichtige Rolle in der Pathogenese der HA, u.a. durch Produktion proinflammatorischer Zytokine mit gewebezerstörenden Eigenschaften spielt (s. 2.3.2). Zum anderen ist zu bedenken, dass die Synovia möglicherweise potenziierend

oder neutralisierend wirken könnte und Synoviozyten über ihre phagozytierenden Eigenschaften die Effekte abschwächen könnten (JANSEN et al., 2007).

So stellte sich *in vitro* heraus, dass Erythrozyten in Kombination mit mononukleären Zellen einen nahezu gleichwertigen Effekt auf die Hemmung der Proteoglycan-Synthese haben wie Vollblut (ROOSENDAAL et al., 1997; ROOSENDAAL et al., 1999b; HOOIVELD et al., 2003b). Durch Zugabe von Blutplasma konnte der Effekt nicht weiter gesteigert werden, allerdings hatte auch Plasma alleine einen, wenn auch deutlich schwächeren, inhibierenden Effekt auf die Proteoglycan-Synthese (ROOSENDAAL et al., 1997). Alle diese Effekte waren dosisabhängig, was weiterhin die Frage aufwirft, inwieweit in den Versuchen dieser Dissertation die für einen Effekt erforderliche Dosis der einzelnen Komponenten erreicht wurde. Die Absicht dabei war, durch Verdünnung der Einzelkomponenten eine Vergleichbarkeit mit dem Vorkommen im Vollblut zu gewährleisten (s. 3.4.3.2).

Eine *in vivo*-Studie an Hunden (FABRY, 1989) kam ebenfalls zu dem Schluss, dass die zellulären Komponenten alleine zu einer Beeinträchtigung des Knorpelstoffwechsels führen, wohingegen Serum alleine keinen signifikanten Effekt im Vergleich zur Injektion von NaCl-Lsg hatte. Dabei zeigten sowohl isolierte Leukozyten als auch Erythrozyten einen signifikanten Effekt. Allerdings wurde, abweichend vom Vorgehen im Rahmen dieser Arbeit (Injektion einer äquivalenten Menge an zellulären Bestandteilen wie sie in 1 ml Vollblut enthalten ist (s. 3.4.3.2)), ein gleiches Volumen an Vollblut wie an Zellen injiziert. Des Weiteren wurde Serum lediglich einem Versuchshund injiziert, sodass die Aussagekraft kritisch gesehen werden muss.

Die Erkenntnis, dass zelluläre Bestandteile *in vitro* einen ähnlichen Effekt auf den Knorpel wie Vollblut haben, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit *in vivo* auch durch das Fehlen von histologischen Befunden einer Gelenkdestruktion nicht bestätigt werden (s. 4.3.7). Zwar ist die Destruktion bei Injektion von zellulären Bestandteilen deutlicher ausgebildet als bei der von Blutplasma, aber der Effekt erreicht bei weitem nicht die Ausprägung wie bei Vollblut-Injektion. Es konnte somit gezeigt werden, dass Vollblut auch bezüglich der histopathologischen Befunde der chronischen Entzündung und der Gelenkdestruktion den stärksten Effekt hat (s. 4.3.7).



Zusammenfassend gesehen waren in den vorliegenden Versuchen die zellulären Blutbestandteile nicht in der Lage, das schmerz-assoziierte Verhalten im gleichen Maße zu beeinflussen wie Vollblut. Bei quantitativer Bewertung der Wirkungen an der Ratte kann gefolgert werden, dass beide Komponenten (Blutplasma und zelluläre Blutbestandteile) nur eine Teilwirkung haben. Erst eine Kombination beider Komponenten, wie im Rahmen der Hämophilie oder bei Vollblut-Injektionen der Fall, führt zu deutlichen schmerz-assoziierten Verhaltensveränderungen. Auch die histopathologischen Befunde spiegeln diese Erkenntnis wieder.

### 5.3 Lithium-Heparinhaltige physiologische Kochsalzlösung

Um mögliche Effekte des Lithium-Heparins, das als Antikaogulans in den verwendeten Monovetten<sup>®</sup> Anwendung findet, auf das schmerz-assoziierte Verhalten darstellen zu können, wurde dieser Versuchsansatz durchgeführt.

In *in vitro*-Studien zur Wirkung von Blut auf Knorpelzellen wird in der Regel mit Lithium-Heparin (mittels kommerziell erhältlicher Blutentnahme-Systeme) ungerinnbar gemachtes Blut verwendet (ROOSENDAAL et al., 1997; ROOSENDAAL et al., 1999b; HOOIVELD et al., 2003a; JANSEN et al., 2007). Hierbei konnte festgestellt werden, dass das Heparin an sich in der verwendeten Dosis den Effekt von Blut auf Knorpelzellen nicht beeinflusst (ROOSENDAAL et al., 1997).

Injektionsversuche werden im Gegensatz dazu meist mit nativem, autologem Vollblut ohne Zusatz von Antikoagulantien durchgeführt (MADHOK et al., 1988; NIIBAYASHI et al., 1995; ROOSENDAAL et al., 1999c; HOOIVELD et al., 2003a), so wie es auch in dieser Arbeit der Fall war.

Selten wurde *in vivo* heparinisiertes Blut verwendet (CONVERY et al., 1976). Als Kontrolle wurde dabei heparinisierte NaCl-Lsg injiziert, es erfolgte aber kein Vergleich mit nativer NaCl-Lsg.

Im Rahmen des „Heparin-Teils“ der Versuche konnten zumindest bei der Beurteilung des schmerz-assoziierten Verhaltens keine statistisch relevanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe (reine NaCl-Lsg) festgestellt werden (s. 4.4).

Bei der Entwicklung des Körpergewichts zeigte sich dagegen ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (s. 4.4.3). Dieses Ergebnis ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Lithium-Heparin-Tiere ein niedrigeres Ausgangsgewicht aufwiesen. Zudem muss auch die kleinere Tierzahl von vier bzw. fünf Tieren (s. 4.4) im Vergleich zur Kontrollgruppe (neun Tiere) berücksichtigt werden, durch die sich Abweichungen bei Einzeltieren schneller auf den Mittelwert der Gruppe auswirkten. Die Ratten der Lithium-Heparin-Gruppe hatten bereits vor Versuchsbeginn langsamer an Gewicht zugenommen. Dies ließ sich auch noch an den ersten Testtagen beobachten; ab Tag 15 zeigten die Versuchstiere dann annähernd gleiche wöchentliche Zunahmen. Daher ist der Unterschied in der Gewichtsentwicklung in diesem Fall nicht als Indiz für eine höhere Morbidität bei Lithium-Heparin-NaCl-Lsg-Injektion zu werten.

Des Weiteren zeigten die Lithium-Heparin-Tiere histopathologische Befunde von zum Teil signifikant geringerer Ausprägung als die Kontrolltiere (s. 4.4.4).

Vergleicht man die caninen *in vivo*-Studien von ROOSENDAAL et al. (1999c) (natives Vollblut) und CONVERY et al. (1976) (heparinisiertes Blut), bei denen jeweils eine intraartikuläre Vollblut-Injektion ins Kniegelenk erfolgte, zeigen sich interessanterweise Unterschiede. So konnte bei der letztgenannten Studie, trotz wesentlich längerer Blutexposition (Injektion fünfmal pro Woche 2 ml), erst nach vier Wochen ein verminderter Glycosaminoglycan-Gehalt des Gelenkknorpels festgestellt werden, eine histologische Degeneration war erst nach 16 Wochen erkennbar.

ROOSENDAAL et al. (1999c) dagegen beobachteten bereits nach nur zweimaliger Blutinjektion ( $6 \pm 2$  ml an Tag 0 und 2) am Tag 4 signifikant verminderte Glycosaminoglycan-Gehalte sowie weitere Veränderungen der Knorpelzusammensetzung.

Zwar konnte *in vitro* kein statistisch signifikanter Wirkungsunterschied von koaguliertem Blut und antikoaguliertem Blut auf den Knorpelstoffwechsel festgestellt werden (JANSEN et al., 2007). Dennoch werfen insbesondere die oben zitierten *in vivo*-Untersuchungen die Frage auf, ob *in vivo* eventuell doch ein Unterschied in der intraartikulären Wirkung besteht.

Zieht man dann in Betracht, dass es, wie aus mehreren *in vivo*-Studien bekannt, bei intraartikulären Injektionen zu Blutungen kommen kann (CONVERY et al., 1976; LIPOWITZ et al., 1985; MADHOK et al., 1988; NIIBAYASHI et al., 1995), könnte das einen Erklärungsansatz für die aufgezeigten statistisch signifikanten Unterschiede in der histopathologischen Befundung liefern.

So konnten bei der autologen intraartikulären Blutinjektion an der Ratte (NIIBAYASHI et al., 1995) beträchtliche subsynoviale und intraartikuläre Blutungen beobachtet werden und es wurde daher komplett auf eine Injektion in das Kontrollknie verzichtet. Dieses Vorgehen wurde auch für ein canines *in vivo*-Modell (ROOSENDAAL et al., 1999c) gewählt.

Vor diesen Untersuchungen konnten bereits entzündliche Veränderungen der Synovialmembran auch bei NaCl-Lsg-Injektion gesehen werden (CONVERY et al., 1976; MADHOK et al., 1988).

Bei Mikroblutungen, wie sie möglicherweise im Falle von intraartikulären Injektionen entstehen, liegt daher die Vermutung nahe, dass das dabei austretende Blut beim Einsatz von mit Lithium-Heparin angereicherter NaCl-Lsg nicht oder nur verzögert

geronnen ist. Bei der Injektion von nativer NaCl-Lsg kommt es dagegen vermutlich zur Koagulation der Mikroblutungen.

Möglicherweise könnte dieser Umstand auch zur Ausbildung der geringeren histopathologischen Befunde im „Heparin-Versuch“ beitragen. Zudem muss auch hier wieder auf die kleinere Tierzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe verwiesen werden, die die statistische Vergleichbarkeit limitiert.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das Antikoagulans Lithium-Heparin keinen zusätzlichen negativen Einfluss auf das Injektions-bedingte schmerz-assoziierte Verhalten, welches der Hauptgegenstand dieser Arbeit war, hat.

Daher sind die Ergebnisse des Ansatzes zur intraartikulären Wirkung einzelner Blutbestandteile im Vergleich zum nativen Vollblut als spezifisch anzusehen.

## 5.4 Diskussion des Modells

Mit der wiederholten, intraartikulären Injektion von autologem Vollblut sollte ein Modell für den Schmerz bei HA entwickelt werden. Dabei gelang es zunächst die Abgrenzung zur einmaligen intraartikulären Blutung, die beim nicht-hämophilen Menschen in Folge eines Traumas nicht selten zu beobachten ist, aufzuzeigen.

Um der Pathophysiologie der Gelenkblutung beim Hämophilen möglichst nahe zu kommen, wurde natives, autologes Vollblut ohne Zusatz von Antikoagulantien injiziert, wie es auch in den meisten bereits durchgeführten *in vivo*-Studien der Fall war (MADHOK et al., 1988; NIIBAYASHI et al., 1995; ROOSENDAAL et al., 1999c; HOOIVELD et al., 2003a). Dabei ist davon auszugehen, dass das injizierte Blut intraartikulär gerinnt. Dagegen ist nicht bekannt, ob und wenn ja, in welchem Maße im Rahmen einer Gelenkblutung beim Hämophilen aus den Gefäßen austretendes Blut im Gelenk gerinnt (JANSEN et al., 2007).

Das Injektionsvolumen von 0,1 ml basiert auf einer Studie von NIIBAYASHI et al. (1995), bei der ebenfalls dem Versuchstier Ratte intraartikulär Blut ins Kniegelenk injiziert wurde.

Als Kontrolle erfolgte eine Volumen-äquivalente Injektion von NaCl-Lsg. Aus mehreren *in vivo*-Studien ist bekannt, dass es im Rahmen des durch die Injektionsnadel ausgelösten Mikrotraumas zu Blutungen kommen kann (CONVERY et al., 1976; LIPOWITZ et al., 1985; MADHOK et al., 1988; NIIBAYASHI et al., 1995). So konnten NIIBAYASHI et al. (1995) bei intraartikulären autologen Blutinjektionen ins Kniegelenk der Ratte, die unter anderem auch in der vorliegenden Arbeit als Vorlage dienten, beträchtliche subsynoviale und intraartikuläre Blutungen beobachten. Sie verzichteten daher ganz auf die Injektion des Kontrollknies. Dieses Vorgehen wählten auch ROOSENDAAL et al. (1999c) für ihr canines *in vivo*-Modell. Eine zusätzliche Berechtigung dieser Vorgehensweise waren auch die entzündlichen Veränderungen der Synovialmembran, die bei NaCl-Lsg-Injektion festgestellt werden konnten (CONVERY et al., 1976; MADHOK et al., 1988).

Die histopathologischen Befunde der vorliegenden Untersuchung legen den Verdacht nahe, dass es auch in diesen Versuchen zu intraartikulären Blutungen bei NaCl-Lsg-Injektion und damit zu einer Beeinträchtigung der Kontrollgelenke gekommen ist. Die Injektion von NaCl-Lsg bei den Kontrolltieren wurde aber als wichtig erachtet, um einen eventuellen Volumeneffekt der injizierten Substanz auf

das schmerz-assoziierte Verhalten oder die Entstehung von Schmerzen durch die intraartikuläre Injektion feststellen zu können.

Die wiederholte Injektion in dasselbe Gelenk sollte dem bekannten Phänomen der Entwicklung eines „Target Joints“ beim Hämophilen, bei dem es zu wiederholten Blutungen in ein betroffenes Gelenk kommt, entsprechen (RODRIGUEZ-MERCHAN & RIBBANS, 1997; RODRIGUEZ-MERCHAN, 1999; JANSEN et al., 2008b; MEJIA-CARVAJAL et al., 2008).

Die Intensität und Frequenz dieser Blutungsereignisse ist meist schwer zu messen und daher auch im Experiment nicht exakt imitierbar (HOOIVELD et al., 2003a).

Der in unserem Tiermodell zu beobachtende Zeitverlauf der schmerz-assoziierten Verhaltensveränderungen spiegelt durchaus den chronischen Charakter der Entwicklung einer HA beim Menschen wieder, bei der ebenfalls erst nach wiederholten Blutungsereignissen klinisch relevante Veränderungen auftreten.

Im Tiermodell konnte darüber hinaus auch eine über die Versuchsdauer abnehmende Schmerzschwelle bei der primären mechanischen Hyperalgesie-Testung beobachtet werden. Interessanterweise zeigte sich dieses Phänomen auch am kontralateralen, nicht-injizierten Kniegelenk und trat in allen Versuchsgruppen auf. Da dieselbe Beobachtung bereits in anderen Arbeiten gemacht wurde (BOETTGER et al., 2010a; BOETTGER et al., 2010b; LEUCHTWEIS et al., 2010), könnte es sich dabei um ein methodisches Problem handeln, das unabhängig von dem Modell der Blut-induzierten Arthropathie auftritt. Dessen Ursache könnte beispielsweise in einer Sensibilisierung oder in einem gewissen Lernverhalten der Versuchstiere aufgrund der vielen Wiederholungen über die relativ lange Versuchsdauer zu suchen sein.

Um die Bedeutung einzelner Blutbestandteile in ihrer Wirkung auf das schmerz-assoziierte Verhalten darstellen zu können, musste im Gegensatz zur autologen Vollblut-Injektion eine Antikoagulation durchgeführt werden. Dazu wurde das in Abschnitt 3.4.3.2 beschriebene Vorgehen gewählt. Es wurde wiederum ein Injektionsvolumen von 0,1 ml appliziert und den Versuchsratten eine äquivalente Menge der einzelnen Komponenten, wie sie in 0,1 ml Vollblut enthalten sind, ins Gelenk injiziert. Diesen Ansatz verfolgten auch verschiedene *in vitro*-Studien (ROOSENDAAL et al., 1997; ROOSENDAAL et al., 1999b), in denen gezeigt werden konnte, dass eine Kombination aus Erythrozyten und mononukleären Zellen den

gleichen Effekt auf Chondrozyten hat wie Vollblut. In der vorliegenden Untersuchung wurde aus Gründen der Praktikabilität für die erforderliche Herstellung einer Plasma-haltigen Injektionslösung ein Hämatokrit von 40% angenommen (s. 3.4.3.2). Abweichungen im Hämatokrit einzelner Tiere blieben somit unberücksichtigt.

Das in einer *in vivo*-Studie zur Wirkung von isolierten Leukozyten bzw. Erythrozyten (FABRY, 1989) gewählte Vorgehen, das gleiche Volumen zu injizieren wie von Vollblut, wurde in der vorliegenden Untersuchung nicht übernommen, weil dies unserer Meinung nach keine adäquate Vergleichbarkeit ermöglicht, da die Wirkungsunterschiede möglicherweise von den zellulären Konzentrationsunterschieden ausgehen könnten.

Damit muss aber auch die Frage nach der Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung der intraartikulär applizierten Blutzellen und dadurch eventuell steigerbarer Effekte im Rahmen dieser Arbeit unbeantwortet bleiben.

Hinsichtlich des „Heparin-Teils“ muss die geringe Tierzahl von vier bzw. fünf Tieren bezüglich des Vergleichs mit der Kontrollgruppe (n=9) berücksichtigt werden. Da sich kein Hinweis auf statistisch signifikante Unterschiede im schmerz-assoziierten Verhalten zeigte, wurde auch aus Tierschutzgründen die Tierzahl nicht weiter erhöht. Eventuell wäre in diesem Zusammenhang auch ein Vergleich zwischen nativem und antikoaguliertem Vollblut, das dann ebenfalls Lithium-Heparin enthalten würde, von Interesse, wobei dann wieder die Problematik der Koagulationsfrage bestünde.

## 5.5 Übertragbarkeit und Nutzen des Modells

Tiermodelle werden zur Untersuchung von Schmerzen im Allgemeinen und von Arthropathien im Speziellen vielfach in der humanmedizinischen Forschung eingesetzt. Ihre Verwendung ist zur Aufklärung von Pathomechanismen sowie darauf aufbauender neuer Therapieprinzipien unumgänglich, da sie eine Brücke zwischen *in vitro*-Studien und klinischen Studien am Menschen schlagen. Da das Wissen über den Pathomechanismus der hämophilen (HA) bzw. Blut-induzierten Arthropathie (BIA) bislang in erster Linie auf *in vitro*-Ergebnissen beruht, musste der *in vivo*-Ansatz im Tiermodell erst noch nachvollzogen werden (JANSEN et al., 2008b).

Allgemein ist die Ratte ein in der Forschung häufig eingesetztes Versuchstier, da sie leicht unter standardisierten Laborbedingungen zu halten ist und in ihren genetischen Eigenschaften bezüglich krankheitsrelevanter Gene dem Menschen recht ähnlich ist (BACHTLER, 2004).

Um die komplexen Veränderungen bei der BIA zu erfassen, ist ein intakter Organismus vonnöten. So kann etwa eine intraartikuläre Entzündungsreaktion oder die Resorption von Blutbestandteilen nicht *in vitro* nachvollzogen werden, da diese zeitabhängigen Vorgänge nur in einem intakten Lebewesen verfolgt werden können. Des Weiteren kann das schmerz-assoziierte Verhalten, der Hauptgegenstand dieser Arbeit, nur am lebenden Tier untersucht werden.

Bereits existierende Tiermodelle zur Untersuchung der HA sind bisher nicht bezüglich schmerz-assoziiertes Verhaltens auffälligkeiten evaluiert worden (s. 2.5), obwohl Schmerzen im Zuge der HA eine große Rolle im täglichen Leben eines Menschen mit Hämophilie spielen (ELANDER et al., 2009).

Da Nager als Versuchstiere in der Regel in höherer Stückzahl zur Verfügung stehen als etwa Hunde, deren Haltung zudem aufwändiger ist und die eine emotional begründete höhere Stellung in der Gesellschaft haben, bietet die Entwicklung eines Ratten-Modells einen neuen, vielversprechenden Ansatzpunkt für die Hämophilie-Forschung. Ein Problem ist jedoch sowohl dem caninen *in vivo*-Modell (ROOSENDAAL et al., 1999c), dem Einsatz von Kaninchen (MADHOK et al., 1988) als auch dem Ratten-Modell für Gelenkschmerz bei Hämophilie gemein: Es sind artifizielle Modelle, denen der genetisch determinierte Gerinnungsfaktor-Mangel des Hämophilen fehlt. Dieser Pathomechanismus ist zwar im murinen Faktor VIII-Knock out-Modell (VALENTINO et al., 2004) gegeben, allerdings ist zur Auslösung einer



intraartikulären Blutung ein Trauma nötig, was wiederum nicht dem Auftreten einer Gelenkblutung beim Hämophilen entspricht.

Jedoch war es nicht Ziel dieser Arbeit, ein Tiermodell zu entwickeln, das die komplette Gelenkspathophysiologie bei Hämophilie abdeckt, sondern der Fokus lag auf dem Teilaspekt des Gelenkschmerzes bei BIA bzw. HA, der infolge von Gelenkblutungen entsteht. Dieser Teilaspekt kann in dem beschriebenen Modell der Ratte mittels intraartikulärer Blut-Injektionen gut nachvollzogen werden.

Die Beurteilung von Schmerzen beim Tier beschränkt sich auf die subjektive Wahrnehmung und Interpretation von Verhaltensänderungen, die dem entstehenden Schmerz zugeschrieben werden können (HENKE et al., 1999). Unter anderem aus diesem Grund spricht man beim Tier auch vom schmerz-assoziiertem Verhalten bzw. von Verhaltensveränderungen. Um eine möglichst umfassende Beurteilung des Schmerzes vornehmen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Tests zur Beurteilung des schmerz-assoziierten Verhaltens durchgeführt, die bereits an anderen Arthritis-Modellen validiert worden waren (BOETTGER et al., 2008; BOETTGER et al., 2009; SEGOND VON BANCHET et al., 2009; BOETTGER et al., 2010a; BOETTGER et al., 2010b; LEUCHTWEIS et al., 2010; SCHAIBLE et al., 2010). Die Kombination verschiedener Tests versprach die Aussagekraft der gewonnenen Ergebnisse zu erhöhen.

Die unmittelbare Übertragbarkeit von an Tiermodellen gewonnenen Erkenntnissen auf den Menschen sollte grundsätzlich immer in Frage gestellt werden. Dennoch stellt die Erprobung neuer Therapieansätze an Versuchstieren eine gängige Praxis der biomedizinischen Forschung dar und ist beispielsweise zur Zulassung neuer Arzneimittel im Rahmen der präklinischen Prüfung sogar gesetzlich verankert.

Das in dieser Arbeit entwickelte Modell für intraartikulären Schmerz bei der HA könnte zumindest zum besseren Verständnis der Pathogenese der HA *in vivo* beitragen. Darüber hinaus ist es ein tierexperimentell umfassend nutzbares Modell, an dem auch in Folgearbeiten neue Therapieansätze zur Behandlung von Gelenkschmerz bei HA erprobt werden können. In diesem Zusammenhang könnten auch neue vielversprechende, bisher ausschließlich *in vitro* erarbeitete Erkenntnisse, wie der Einsatz des anti-inflammatorisch wirkenden Zytokins Interleukin-10 (IL-10), das *in vitro* zusätzlich einen Knorpel-protectiven Effekt zeigt (JANSEN et al., 2008a), hinsichtlich ihrer Effektivität *in vivo* untersucht werden.

Derartige Erkenntnisse wären aber nicht nur für die Humanmedizin von Interesse, sie könnten auch auf andere Spezies übertragen werden, da Gelenkblutungen im Zuge der Hämophilie auch bei den Haussäugetieren auftreten (s. 2.2). Nicht zuletzt könnten mit diesem Tiermodell auch Erkenntnisse gewonnen werden, die der Therapie degenerativer Arthritiden anderer Genese zugutekommen, wie beispielsweise der Arthrose, die bei allen Wirbeltieren auftreten kann (OEGEMA & VISCO, 1999) und deren Behandlung bei den Haussäugetieren, insbesondere bei Hund und Pferd, ebenfalls große Bedeutung hat.

## 5.6 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit sollte der Effekt von intraartikulärem Blut auf das schmerz-assoziierte Verhalten bei Ratten mit dem Ziel untersucht werden, ein Tiermodell für die Darstellung des Gelenkschmerzes bei der hämophilen Arthropathie zu etablieren.

Aufgrund der Ergebnisse können folgende Aussagen getroffen werden:

1. Die wiederholte intraartikuläre Vollblut-Injektion ruft schmerz-assoziierte Verhaltensveränderungen hervor, die den klinischen Erscheinungen beim Hämophilen ähneln. Als ursächlich hervorzuheben ist hierbei die Entwicklung einer primären Hyperalgesie und das Auftreten von Entzündungsanzeichen.
2. Anhand der Möglichkeit im Experiment zwischen einmaliger und mehrmaliger Injektion zu variieren, kann mit diesem Modell sowohl die hämophile Arthropathie als auch die einmalige Gelenkblutung pathophysiologisch differenziert werden.
3. Vollblut hat den stärksten Effekt auf das schmerz-assoziierte Verhalten und auch auf die histopathologischen Befunde im Gelenk. Die Teilwirkungen von injiziertem Blutplasma oder von zellulären Blutbestandteilen ergänzen sich offensichtlich im Vollblut.

Mit der experimentellen Vorgehensweise einer mehrmaligen, intraartikulären autologen Vollblut-Injektion an der Ratte ist es gelungen, erstmalig für den Gelenkschmerz bei Hämophilie ein geeignetes Tiermodell zu etablieren, das auch die Option der Erprobung neuer Therapieansätze beinhaltet.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Hämophilie stellt die häufigste, schwerwiegende hereditäre Hämostasestörung bei Mensch und Tier dar. In Zeiten moderner Therapiemöglichkeiten in der Humanmedizin, in denen lebensbedrohliche Blutungskomplikationen an Bedeutung verlieren und die Lebenserwartung stark ansteigt, rücken die sekundären klinischen Komplikationen in den Vordergrund. Trotz Substitution der fehlenden Gerinnungsfaktoren können spontane Blutungen, die am häufigsten in synovialen Gelenken auftreten, nicht vollständig verhindert werden. Daher stellen degenerative Gelenkveränderungen, die sich infolge wiederholter intraartikulärer Blutungen entwickeln können, die häufigste Morbiditätsursache bei Menschen mit Hämophilie dar. Wie andere degenerative Arthropathien bringt auch die sogenannte hämophile Arthropathie (HA) Schmerzen und Bewegungseinschränkungen mit sich, die zu einer Beeinträchtigung der Lebensqualität führen können. Aber nicht nur chronische Schmerzen, sondern auch akute Schmerzen, die im Rahmen einer akuten intraartikulären Blutung auftreten, spielen eine große Rolle im Leben eines Hämophilen.

Trotz dieser enormen Bedeutung von Gelenkschmerzen ist dieser Aspekt bisher nur wenig wissenschaftlich untersucht worden. Etablierte *in vivo*-Modelle beschränken sich in erster Linie auf die Untersuchung entzündlicher und degenerativer Gelenkveränderungen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss von intraartikulärem Blut auf das schmerz-assoziierte Verhalten zu untersuchen.

Hierfür wurde das bereits etablierte Modell der intraartikulären autologen Vollblut-Injektion ins Kniegelenk der Ratte zugrunde gelegt und die injizierten Tiere hinsichtlich des schmerz-assoziierten sowie des motorischen Verhaltens untersucht. Zudem erfolgte am Versuchsende eine histopathologische Befundung der Kniegelenke. Als Kontrolle dienten Ratten, denen ein äquivalentes Volumen physiologischer Kochsalzlösung intraartikulär injiziert wurde.

Um der HA des Menschen sehr nahekommende Veränderungen hervorzurufen, erfolgte die intraartikuläre Blut-Injektion mehrmals hintereinander. Zur Abgrenzung dieser Ergebnisse von einmaligen Blutungsereignissen, wie sie auch bei nicht-hämophilen Menschen im Zuge eines Traumas vorkommen können, erfolgten auch einmalige Vollblut-Injektionen.

Des Weiteren wurde der intraartikuläre Effekt einzelner Blutbestandteile untersucht. Im Zuge der wiederholten autologen Vollblut-Injektion konnten am Versuchstier Veränderungen des schmerz-assoziierten Verhaltens beobachtet werden, die der klinischen Manifestation von Gelenkblutungen beim Hämophilen ähneln. Hervorzuheben sind hierbei die Ausbildung einer primären Hyperalgesie, das Auftreten von Lahmheiten sowie die Entwicklung von klinischen Entzündungsanzeichen an der injizierten Extremität. Eine einmalige Injektion führte dagegen zu keinen signifikanten Veränderungen bei diesen Untersuchungsparametern.

Die mehrmalige Injektion von Vollblut hatte sowohl auf das schmerz-assoziierte Verhalten als auch auf die histopathologischen Befunde den deutlichsten Effekt. Blutplasma und zelluläre Blutbestandteile waren in ihrer Teilwirkung quantitativ ähnlich, erreichten aber einzeln den Effekt von Vollblut nicht, sondern zeigten etwa halbmaximale Effekte. Offensichtlich sind beide Bestandteile in Vollblut an deren Pathogenese wesentlich beteiligt.

Mit dem Versuchsschema der mehrmaligen, intraartikulären autologen Vollblut-Injektion an der Ratte ist es gelungen, erstmalig ein Tiermodell für den Gelenkschmerz bei Hämophilie zu etablieren, das auch der Erprobung neuer Therapieansätze dienen könnte.

Zudem können die Ergebnisse dieser Arbeit sowie nachfolgender Arbeiten an diesem Modell möglicherweise einen Beitrag zur weiteren Aufklärung der Pathogenese der HA liefern. Die bisher gewonnenen Erkenntnisse beruhen in erster Linie auf in ihrer Aussage sehr eingeschränkten *in vitro*-Studien.

## 7 SUMMARY

### Validation of an animal model for hemophilia-associated joint pain

Hemophilia is the most common inherited severe coagulation disorder in humans as well as in animals. Today, life threatening complications in human medicine are rare due to modern treatment. As a result, life expectancy has increased and secondary clinical complications are gaining significance. However, despite substitution with coagulative factors, spontaneous bleeding, which is most often observed in synovial joints, cannot be prevented completely. Thus, blood-induced degenerative joint damage is the main cause of morbidity in patients suffering from hemophilia. Similar to other degenerative joint disorders, so-called "hemophilic arthropathy" (HA) goes along with pain and a loss in range of motion which can impair quality of life. Besides chronic pain, acute pain as arises in case of hemarthrosis, is of importance in the daily life of people with hemophilia.

Despite the tremendous significance of joint pain, this aspect has not been subject of many scientific studies to date. Established *in vivo* models mainly focused on inflammatory and degenerative changes occurring in the joints.

This study's objective therefore was to investigate the influence of intraarticular blood on pain-related behavior.

To meet this purpose, the established model of intraarticular autologous whole blood injection in the rat's knee was taken as a basis and validated for pain-related and locomotor behavior. Furthermore, the knee joints were evaluated histopathologically at the end of the study. Rats that were injected intraarticular with an equivalent volume of saline served as controls.

The injections were done repeatedly in order to mimic the pathogenesis in people with hemophilia and to evoke changes resembling those in human HA. By comparing the results with a single injection procedure, it was possible to distinguish from single bleeding events that can also take place in non-hemophiliacs as a result of trauma.

In addition, the intraarticular effect of blood components (cellular and plasma) was analysed.

In the course of repeated autologous injection of whole blood, alterations of pain related-behavior could be observed in the test animals, resembling the clinical manifestation of intraarticular blood in people with hemophilia. Major observations

were the development of primary hyperalgesia, clinical signs of inflammation and the occurrence of lameness at the treated limb. In contrast, a single injection did not cause significant changes.

Alterations in pain-related behavior as well as in histopathological findings were most obvious by injecting whole blood repeatedly. The impact of blood plasma and cellular components was similar, but did not reach the effect of whole blood. Overall, the components showed about half-maximal effects, thereby indicating a role for both components in whole blood in the underlying pathophysiology.

With the pattern of repeated injections of autologous whole blood in the rat's knee joint, a preclinical model for joint pain in hemophilia could be established successfully for the first time which allows the examination of new therapeutic strategies in the future.

In addition, the results of this study and following studies using this animal model may contribute to further elucidating the pathogenesis of HA which is based mainly on *in vitro* findings to date, which are limited in their conclusion.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

### **ABRAMS-OGG A (2009)**

Hämophilie A (klassische Hämophilie), Hämophilie B (Christmas-Krankheit).

In: Rand J (Hrsg.): Praxishandbuch Katzenkrankheiten, Urban & Fischer bei Elsevier, München; 582-586.

### **AIRD B (2000)**

Acute Blood Loss Anemia.

In: Feldman B, Zinkl J, Jain N, Schalm O (Hrsg.): Schalm's veterinary hematology Lippincott Williams & Wilkins; 151-153.

### **ARCHER CW, FRANCIS-WEST P (2003)**

The chondrocyte.

Int J Biochem Cell Biol; 35: 401-404.

### **ARCHER RK, ALLEN BV (1972)**

True haemophilia in horses.

Vet Rec; 91: 655-656.

### **ARNOLD WD, HILGARTNER MW (1977)**

Hemophilic arthropathy. Current concepts of pathogenesis and management.

J Bone Joint Surg Am; 59: 287-305.

### **BACHTLER B (2004)**

Genom der Labormaus entziffert und analysiert – Neue Erkenntnisse über

Krankheitsursachen erwartet - Einblick in die Evolution der Säugetiere.

Max Delbrück Center for Molecular Medicine Berlin-Buch, Member of the Helmholtz

Association: [http://www.mdc.helmholtz.de/de/news/archive/2004/20040331-genom\\_der\\_labormaus\\_entziffert\\_und\\_analys/index.html](http://www.mdc.helmholtz.de/de/news/archive/2004/20040331-genom_der_labormaus_entziffert_und_analys/index.html).

Zugriff: 05.03.2011



**BARTON NJ, STRICKLAND IT, BOND SM, BRASH HM, BATE ST, WILSON AW, CHESSELL IP, REEVE AJ, McQUEEN DS (2007)**

Pressure application measurement (PAM): a novel behavioural technique for measuring hypersensitivity in a rat model of joint pain.

J Neurosci Methods; 163: 67-75.

**BENNETT GJ (2000)**

Update on the neurophysiology of pain transmission and modulation: focus on the NMDA-receptor.

J Pain Symptom Management; 19: 2-6.

**BERNTORP E, BOULYJENKOV V, BRETTLER D, CHANDY M, JONES P, LEE C, LUSHER J, MANNUCCI P, PEAK I, RICKARD K, ET AL. (1995)**

Modern treatment of haemophilia.

Bull World Health Organ; 73: 691-701.

**BI L, LAWLER AM, ANTONARAKIS SE, HIGH KA, GEARHART JD, KAZAZIAN HH, JR. (1995)**

Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A.

Nat Genet; 10: 119-121.

**BI L, SARKAR R, NAAS T, LAWLER AM, PAIN J, SHUMAKER SL, BEDIAN V, KAZAZIAN HH, JR. (1996)**

Further characterization of factor VIII-deficient mice created by gene targeting: RNA and protein studies.

Blood; 88: 3446-3450.

**BILNEY B, MORRIS M, WEBSTER K (2003)**

Concurrent related validity of the GAITRite walkway system for quantification of the spatial and temporal parameters of gait.

Gait Posture; 17: 68-74.

**BLADEN M, ALDERSON L, KHAIR K, LIESNER R, GREEN J, MAIN E (2007)**

Can early subclinical gait changes in children with haemophilia be identified using the GAITRite walkway.

Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia; 13: 542-547.

**BOETTGER MK, HENSELLEK S, RICHTER F, GAJDA M, STOCKIGT R, VON BANCHET GS, BRAUER R, SCHAIBLE H-G (2008)**

Antinociceptive effects of tumor necrosis factor alpha neutralization in a rat model of antigen-induced arthritis: evidence of a neuronal target.

Arthritis Rheum; 58: 2368-2378.

**BOETTGER MK, WEBER K, SCHMIDT M, GAJDA M, BRAUER R, SCHAIBLE HG (2009)**

Gait abnormalities differentially indicate pain or structural joint damage in monoarticular antigen-induced arthritis.

Pain; 145: 142-150.

**BOETTGER MK, WEBER K, GAJDA M, BRAUER R, SCHAIBLE HG (2010a)**

Spinally applied ketamine or morphine attenuate peripheral inflammation and hyperalgesia in acute and chronic phases of experimental arthritis.

Brain Behav Immun; 24: 474-485.

**BOETTGER MK, WEBER K, GROSSMANN D, GAJDA M, BAUER R, BAR KJ, SCHULZ S, VOSS A, GEIS C, BRAUER R, SCHAIBLE HG (2010b)**

Spinal tumor necrosis factor alpha neutralization reduces peripheral inflammation and hyperalgesia and suppresses autonomic responses in experimental arthritis: a role for spinal tumor necrosis factor alpha during induction and maintenance of peripheral inflammation.

Arthritis Rheum; 62: 1308-1318.

**BRINKHOUS KM, GRAHAM JB (1950)**

Hemophilia in the female dog.

Science; 111: 723-724.

**BRINKHOUS KM, DAVIS PD, GRAHAM JB, DODDS WJ (1973)**

Expression and linkage of genes for X-linked hemophilias A and B in the dog.  
Blood; 41: 577-585.

**BROOKS M (1999)**

A review of canine inherited bleeding disorders: biochemical and molecular strategies for disease characterization and carrier detection.  
J Hered; 90: 112-118.

**BROWN TJ, LAURENT UB, FRASER JR (1991)**

Turnover of hyaluronan in synovial joints: elimination of labelled hyaluronan from the knee joint of the rabbit.  
Exp Physiol; 76: 125-134.

**BUCKWALTER JA, MARTIN J (1995)**

Degenerative joint disease.  
Clin Symp; 47: 1-32.

**BURKHARDT H, SCHWINGEL M, MENNINGER H, MACARTNEY HW, TSCHESCHE H (1986)**

Oxygen radicals as effectors of cartilage destruction. Direct degradative effect on matrix components and indirect action via activation of latent collagenase from polymorphonuclear leukocytes.  
Arthritis Rheum; 29: 379-387.

**BUZZARD BM (1998)**

Proprioceptive training in haemophilia.  
Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia; 4: 528-531.

**CAGNONI PJ, ALEDORT L (1994)**

Gastrointestinal bleeding in hemophilia as a complication of the use of over the counter non-steroidal anti-inflammatory drugs.  
Am J Hematol; 47: 336-337.

**CAMPBELL JN, MEYER RA (1983)**

Sensitization of unmyelinated nociceptive afferents in monkey varies with skin type.  
J Neurophysiol; 49: 98-110.

**CHOINIERE M, MELZACK R (1987)**

Acute and chronic pain in hemophilia.  
Pain; 31: 317-331.

**CONVERY FR, WOO SL, AKESON WH, AMIEL D, MALCOM LL (1976)**

Experimental hemarthrosis in the knee of the mature canine.  
Arthritis Rheum; 19: 59-67.

**COUTO C (2006)**

Störungen der Hämostase (Koagulopathien).  
In: Nelson R, Couto C (Hrsg.): Innere Medizin der Kleintiere  
Urban & Fischer, München; 1277-1291.

**CRAIG M, KESSLER C, GUGLIELMO M (2006)**

Clinical Manifestations and Therapy of the Hemophilias.  
Haemostasis and Thrombosis, Lippincott Williams and Wilkens, Philadelphia; 887-904.

**DABBAGH AJ, TRENAM CW, MORRIS CJ, BLAKE DR (1993)**

Iron in joint inflammation.  
Annals of the rheumatic diseases; 52: 67-73.

**DALY HM, SCOTT GL (1984)**

Extensive ecchymoses due to ibuprofen therapy in the management of haemophiliac arthropathy.  
Clin Lab Haematol; 6: 85-87.

**DE MEDINACELI L, FREED WJ, WYATT RJ (1982)**

An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks.

Exp Neurol; 77: 634-643.

**DEHAVEN KE (1980)**

Diagnosis of acute knee injuries with hemarthrosis.

Am J Sports Med; 8: 9-14.

**DODDS J (1983)**

Inherited coagulation disorders in the dog.

In Pract; 5: 54-58.

**DORN T, SCHAIBLE HG, SCHMIDT RF (1991)**

Response properties of thick myelinated group II afferents in the medial articular nerve of normal and inflamed knee joints of the cat.

Somatosens Mot Res; 8: 127-136.

**DOUGHERTY PM, WILLIS WD (1992)**

Enhanced responses of spinothalamic tract neurons to excitatory amino acids accompany capsaicin-induced sensitization in the monkey.

J Neurosci; 12: 883-894.

**EDWARDS JC (1994)**

The nature and origins of synovium: experimental approaches to the study of synoviocyte differentiation.

J Anat; 184 (Pt 3): 493-501.

**ELANDER J, ROBINSON G, MITCHELL K, MORRIS J (2009)**

An assessment of the relative influence of pain coping, negative thoughts about pain, and pain acceptance on health-related quality of life among people with hemophilia.

Pain; 145: 169-175.

**ERHARDT W, HENKE J (2004)**

Versuchstiere.

In: Erhardt W, Henke J, Haberstroh J (Hrsg.): Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier sowie bei Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen, Schattauer, Stuttgart; 691-723.

**ERHARDTSEN E, EZBAN M, MADSEN MT, DINESS V, GLAZER S, HEDNER U, NORDFANG O (1995)**

Blocking of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) shortens the bleeding time in rabbits with antibody induced haemophilia A.

Blood Coagul Fibrinolysis; 6: 388-394.

**FABRY G (1989)**

Early changes in the ground substance of articular cartilage in experimental hemarthrosis in dogs, measured by the fixed-charge density method.

Arch Orthop Trauma Surg; 108: 76-91.

**FELSON DT (2005)**

The sources of pain in knee osteoarthritis.

Curr Opin Rheumatol; 17: 624-628.

**FEY K (2006)**

Störungen der Hämostase.

In: Dietz O, Huskamp B (Hrsg.): Handbuch Pferdepraxis  
Enke, Stuttgart; 283-288.

**FIELD RA, RICKARD CG, HUTT FB (1946)**

Hemophilia in a family of dogs.

Cornell Vet; 36: 285-300.

**FISCHER K, VAN HOUT BA, VAN DER BOM JG, GROBBEE DE, VAN DEN BERG HM (2002)**

Association between joint bleeds and Pettersson scores in severe haemophilia.

Acta Radiol; 43: 528-532.

**FRY MM, MCGAVIN MD (2009)**

Koagulationsstörungen.

In: McGavin D, Zachary J (Hrsg.): Pathologie der Haustiere: Allgemeine, spezielle und funktionelle Veterinärpathologie

Urban & Fischer bei Elsevier, München; 741-742.

**GARNERO P (2006)**

Noninvasive biochemical markers in osteoarthritis.

In: Moskowitz RW, Altman RD, Hochberg MC, Buckwalter JA, Goldberg VM (Hrsg.):

Osteoarthritis: Diagnosis and Medical/ Surgical Management

Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia; 215-232.

**GASSMANN M, LUTZ TA (2005a)**

Flüssige Bestandteile des Blutes.

In: Engelhardt W, Breves G (Hrsg.): Physiologie der Haustiere

Enke, Stuttgart; 193-198.

**GASSMANN M, LUTZ TA (2005b)**

Zelluläre Bestandteile des Blutes.

In: Engelhardt W, Breves G (Hrsg.): Physiologie der Haustiere

Enke, Stuttgart; 198-207.

**GÖBEL T, KASPERS B (2005)**

Hämostase.

In: Engelhardt W, Breves G (Hrsg.): Physiologie der Haustiere

Enke, Stuttgart; 207-212.

**GRAHAM JB, BUCKWALTER JA, ET AL. (1949)**

Canine hemophilia; observations on the course, the clotting anomaly, and the effect of blood transfusions.

J Exp Med; 90: 97-111.

**GRIFFITHS RJ (1992)**

Characterisation and pharmacological sensitivity of antigen arthritis induced by methylated bovine serum albumin in the rat.

Agents Actions; 35: 88-95.

**GRIGG P, SCHAIBLE HG, SCHMIDT RF (1986)**

Mechanical sensitivity of group III and IV afferents from posterior articular nerve in normal and inflamed cat knee.

J Neurophysiol; 55: 635-643.

**HAKOBYAN N, KAZARIAN T, JABBAR AA, JABBAR KJ, VALENTINO LA (2004)**

Pathobiology of hemophilic synovitis I: overexpression of mdm2 oncogene.

Blood; 104: 2060-2064.

**HAKOBYAN N, KAZARIAN T, VALENTINO LA (2005)**

Synovitis in a murine model of human factor VIII deficiency.

Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia; 11: 227-232.

**HÄMOPHILIEGESELLSCHAFT (2011)**

Geschichte der Hämophilie.

Deutsche Hämophiliegesellschaft: <http://www.dhg.de/Haemophilie.41.0.html>.

Zugriff: 09.02.2011

**HÄMOPHILIEZENTRUM (2011)**

Geschichte der Hämophilie.

Hämophiliezentrum München, Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinik für Anästhesiologie, Abteilung für Transfusionsmedizin und

Hämostaseologie: <http://www.haemophiliezentrum-muenchen.de/content.aspx?menu=18,8,105>.

Zugriff: 09.02.2011

**HARDAKER WT, JR., GARRETT WE, JR., BASSETT FH, 3RD (1990)**

Evaluation of acute traumatic hemarthrosis of the knee joint.

South Med J; 83: 640-644.



**HARGREAVES K, DUBNER R, BROWN F, FLORES C, JORIS J (1988)**

A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia.

Pain; 32: 77-88.

**HENKE J, BRILL T, ERHARDT W (1999)**

Schmerzbelastung, -erkennung, -behandlung.

Tierlaboratorium; 21: 117-125.

**HENKE J, ERHARDT W (2004)**

Analgesie.

In: Erhardt W, Henke J, Haberstroh J (Hrsg.): Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier sowie bei Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen, Schattauer, Stuttgart; 369-407.

**HENLE ES, LINN S (1997)**

Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide.

J Biol Chem; 272: 19095-19098.

**HILBERG T, CZEPA D, FREIALDENHOVEN D, BOETTGER MK (2011)**

Joint pain in people with hemophilia depends on joint status.

Pain; 152: 2029-2035.

**HILGARTNER MW, ARNOLD WD, GRANDA JL (1972)**

Acid Phosphatase Levels in Synovial Tissue and Fluid in Patients with Hemophilia. Proceedings of the Fourteenth International Congress of Hematology, Sao Paulo

**HOAGLUND FT (1967)**

Experimental hemarthrosis. The response of canine knees to injections of autologous blood.

J Bone Joint Surg Am; 49: 285-298.

**HOOIVELD M, ROOSENDAAL G, VIANEN M, VAN DEN BERG M, BIJLSMA J, LAFEBER F (2003a)**

Blood-induced joint damage: longterm effects in vitro and in vivo.  
J Rheumatol; 30: 339-344.

**HOOIVELD M, ROOSENDAAL G, WENTING M, VAN DEN BERG M, BIJLSMA J, LAFEBER F (2003b)**

Short-term exposure of cartilage to blood results in chondrocyte apoptosis.  
Am J Pathol; 162: 943-951.

**HOOIVELD MJ, ROOSENDAAL G, VAN DEN BERG HM, BIJLSMA JW, LAFEBER FP (2003c)**

Haemoglobin-derived iron-dependent hydroxyl radical formation in blood-induced joint damage: an in vitro study.  
Rheumatology (Oxford); 42: 784-790.

**HOOIVELD MJ, ROOSENDAAL G, JACOBS KM, VIANEN ME, VAN DEN BERG HM, BIJLSMA JW, LAFEBER FP (2004)**

Initiation of degenerative joint damage by experimental bleeding combined with loading of the joint: a possible mechanism of hemophilic arthropathy.  
Arthritis Rheum; 50: 2024-2031.

**HOOTS WK, RODRIGUEZ N, BOGGIO L, VALENTINO LA (2007)**

Pathogenesis of haemophilic synovitis: clinical aspects.  
Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia; 13 Suppl 3: 4-9.

**HOUGH AJ, BANFIELD WG, SOKOLOFF L (1976)**

Cartilage in hemophilic arthropathy. Ultrastructural and microanalytical studies.  
Arch Pathol Lab Med; 100: 91-96.

**IASP (1978)**

Report of subcommittee on taxonomy.  
Pain; 6: 249- 252.

**JAIN N (1993)**

Coagulation and Its Disorders.

In: Mundorff G (Hrsg.): Essentials of veterinary hematology

Lea & Febiger, Media, PA; 92-95.

**JANSEN NW, ROSENDAAL G, HOOVELD MJ, BIJLSMA JW, VAN ROON JA, THEOBALD M, LAFEBER FP (2008a)**

Interleukin-10 protects against blood-induced joint damage.

British journal of haematology; 142: 953-961.

**JANSEN NW, ROSENDAAL G, LAFEBER FP (2008b)**

Understanding haemophilic arthropathy: an exploration of current open issues.

British journal of haematology; 143: 632-640.

**JANSEN NWD, ROSENDAAL G, BIJLSMA JWJ, DEGROOT J, LAFEBER FPJG (2007)**

Exposure of human cartilage tissue to low concentrations of blood for a short period of time leads to prolonged cartilage damage: an in vitro study.

Arthritis Rheum; 56: 199-207.

**JIN DY, ZHANG TP, GUI T, STAFFORD DW, MONAHAN PE (2004)**

Creation of a mouse expressing defective human factor IX.

Blood; 104: 1733-1739.

**JORGE FILHO D, BATTISTELLA LR, LOURENCO C (2006)**

Computerized pedobarography in the characterization of ankle-foot instabilities of haemophilic patients.

Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia; 12: 140-146.

**KEMKES-MATTHES B, OEHLER G (2001)**

Angeborene Störungen.

In: Kemkes-Matthes B, Oehler G (Hrsg.): Blutgerinnung und Thrombose, Thieme,

Stuttgart; 37-45.

**KEY JA (1929)**

Experimental arthritis: the reaction of joints to mild irritants.

J Bone Joint Surg; 11: 705-738.

**KOBAYASHI S, KOKUBO Y, UCHIDA K, YAYAMA T, TAKENO K, NEGORO K, NAKAJIMA H, BABA H, YOSHIZAWA H (2005)**

Effect of lumbar nerve root compression on primary sensory neurons and their central branches: changes in the nociceptive neuropeptides substance P and somatostatin.

Spine (Phila Pa 1976); 30: 276-282.

**KUNDU RK, SANGIORGI F, WU LY, KURACHI K, ANDERSON WF, MAXSON R, GORDON EM (1998)**

Targeted inactivation of the coagulation factor IX gene causes hemophilia B in mice.

Blood; 92: 168-174.

**LAMOTTE RH, LUNDBERG LE, TOREBJORK HE (1992)**

Pain, hyperalgesia and activity in nociceptive C units in humans after intradermal injection of capsaicin.

J Physiol; 448: 749-764.

**LANGDELL RD, WAGNER RH, BRINKHOUS KM (1953)**

Effect of antihemophilic factor on one-stage clotting tests; a presumptive test for hemophilia and a simple one-stage antihemophilic factor assay procedure.

J Lab Clin Med; 41: 637-647.

**LECHNER K, PABINGER-FASCHING I (2007)**

Hämorrhagische Diathesen.

In: Gerok W, Huber C, Meinertz T, Zeidler H (Hrsg.): Die Innere Medizin:

Referenzwerk für den Facharzt, Schattauer, Stuttgart; 79-100.

**LEUCHTWEIS J, IMHOF AK, MONTECHIARO F, SCHAIBLE HG, BOETTGER MK (2010)**

Validation of the digital pressure application measurement (PAM) device for detection of primary mechanical hyperalgesia in rat and mouse antigen-induced knee joint arthritis.

Methods Find Exp Clin Pharmacol; 32: 575-583.

**LIN HF, MAEDA N, SMITHIES O, STRAIGHT DL, STAFFORD DW (1997)**

A coagulation factor IX-deficient mouse model for human hemophilia B.

Blood; 90: 3962-3966.

**LINDSEY J (1979)**

The laboratory rat: volume I - biology and diseases.

In: Baker H, Weisbroth S (Hrsg.): Academic Press, New York;

**LIPOWITZ AJ, WONG PL, STEVENS JB (1985)**

Synovial membrane changes after experimental transection of the cranial cruciate ligament in dogs.

Am J Vet Res; 46: 1166-1170.

**LOHMANDER LS, ROOS H (1994)**

Knee ligament injury, surgery and osteoarthritis. Truth or consequences?

Acta Orthop Scand; 65: 605-609.

**LOZIER JN, DUTRA A, PAK E, ZHOU N, ZHENG Z, NICHOLS TC, BELLINGER DA, READ M, MORGAN RA (2002)**

The Chapel Hill hemophilia A dog colony exhibits a factor VIII gene inversion.

Proc Natl Acad Sci U S A; 99: 12991-12996.

**LYON M (1961)**

Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.).

Nature; 190: 372-373.

**MADHOK R, BENNETT D, STURROCK RD, FORBES CD (1988)**

Mechanisms of joint damage in an experimental model of hemophilic arthritis.  
Arthritis Rheum; 31: 1148-1155.

**MADHOK R, YORK J, STURROCK RD (1991)**

Haemophilic arthritis.  
Annals of the rheumatic diseases; 50: 588-591.

**MAINARDI CL, LEVINE PH, WERB Z, HARRIS ED, JR. (1978)**

Proliferative synovitis in hemophilia: biochemical and morphologic observations.  
Arthritis Rheum; 21: 137-144.

**MANCO-JOHNSON MJ, NUSS R, GERAGHTY S, FUNK S, KILCOYNE R (1994)**

Results of secondary prophylaxis in children with severe hemophilia.  
Am J Hematol; 47: 113-117.

**MANCO-JOHNSON MJ, ABSHIRE TC, SHAPIRO AD, RISKE B, HACKER MR, KILCOYNE R, INGRAM JD, MANCO-JOHNSON ML, FUNK S, JACOBSON L, VALENTINO LA, HOOTS WK, BUCHANAN GR, DIMICHELE D, RECHT M, BROWN D, LEISSINGER C, BLEAK S, COHEN A, MATHEW P, MATSUNAGA A, MEDEIROS D, NUGENT D, THOMAS GA, THOMPSON AA, McREDMOND K, SOUCIE JM, AUSTIN H, EVATT BL (2007)**

Prophylaxis versus episodic treatment to prevent joint disease in boys with severe hemophilia.  
N Engl J Med; 357: 535-544.

**MANNHALTER C (2004)**

Molekularbiologische Grundlagen der Hämophilie A und B und des Von-Willebrand-Syndroms.

In: Hämophiliegesellschaft Ö (Hrsg.): Hämophilie: die Antworten ; ein Nachschlagewerk für Betroffene, Angehörige, Ärzte und Schwestern  
Eschig, Wien; 19-25.

**MANSELL P (2000)**

Hemophilia A and B.

In: Feldman B, Zinkl J, Jain N, Schalm O (Hrsg.): Schalm's veterinary hematology  
Lippincott Williams & Wilkins; 1026-1029.

**McDOUGALL JJ, WATKINS L, LI Z (2006)**

Vasoactive intestinal peptide (VIP) is a modulator of joint pain in a rat model of osteoarthritis.

Pain; 123: 98-105.

**McLARDY SMITH PD, ASHTON IK, DUTHIE RB (1984)**

A tissue culture model of cartilage breakdown in haemophilic arthropathy.

Scand J Haematol Suppl; 40: 215-220.

**MEJIA-CARVAJAL C, HAKOBYAN N, ENOCKSON C, VALENTINO LA (2008)**

The impact of joint bleeding and synovitis on physical ability and joint function in a murine model of haemophilic synovitis.

Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia; 14: 119-126.

**MESSESLINGER K (1997)**

Was ist ein Nozizeptor?

Schmerz; 11: 353-366.

**MILLAN MJ (2002)**

Descending control of pain.

Prog Neurobiol; 66: 355-474.

**MISCHKE R, RIVERA RAMIREZ PA, DENIZ A, HANIES R, OTTO K (1996)**

Hamophilie A beim Hund: Symptome, Blutgerinnungsanalyse und Behandlung.

Berl Munch Tierarztl Wochenschr; 109: 279-287.

**MISCHKE R (2003)**

Hämophilie A und B.

In: Mischke R (Hrsg.): Praktische Hämatologie bei Hund und Katze, Schlütersche, Hannover; 203-205.

**MORRIS CJ, EARL JR, TRENAM CW, BLAKE DR (1995)**

Reactive oxygen species and iron--a dangerous partnership in inflammation.

Int J Biochem Cell Biol; 27: 109-122.

**MUCHITSCH EM, TURECEK PL, ZIMMERMANN K, PICHLER L, AUER W, RICHTER G, GRITSCH H, SCHWARZ HP (1999)**

Phenotypic expression of murine hemophilia.

Thromb Haemost; 82: 1371-1373.

**MUIR H (1995)**

The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules.

Bioessays; 17: 1039-1048.

**MUIRDEN KD (1969)**

Clearance of Fe<sup>59</sup>-labelled erythrocytes from normal and inflamed rabbit knee joints.

I. Relationship to the anaemia of rheumatoid arthritis.

Annals of the rheumatic diseases; 28: 548-551.

**MUIRDEN KD, PEACE G (1969)**

Light and electron microscope studies in carrageenin, adjuvant, and tuberculin-induced arthritis.

Annals of the rheumatic diseases; 28: 392-401.

**MULISCH M, WELSCH U (2010)**

Hämalaune.

In: Mulisch M, Welsch U (Hrsg.): Romeis Mikroskopische Technik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; 199-202.



**MURTAUGH RJ, DODDS WJ (1988)**

Hemophilia A in a female dog.

J Am Vet Med Assoc; 193: 351-352.

**NIIBAYASHI H, SHIMIZU K, SUZUKI K, YAMAMOTO S, YASUDA T, YAMAMURO T (1995)**

Proteoglycan degradation in hemarthrosis. Intraarticular, autologous blood injection in rat knees.

Acta Orthop Scand; 66: 73-79.

**NISHIYA K (1994)**

Stimulation of human synovial cell DNA synthesis by iron.

J Rheumatol; 21: 1802-1807.

**NOYES FR, BASSETT RW, GROOD ES, BUTLER DL (1980)**

Arthroscopy in acute traumatic hemarthrosis of the knee. Incidence of anterior cruciate tears and other injuries.

J Bone Joint Surg Am; 62: 687-695.

**O'BRIEN DP, GILES AR, TATE KM, VE HAR GA (1988)**

Factor VIII-bypassing activity of bovine tissue factor using the canine hemophilic model.

J Clin Invest; 82: 206-211.

**OEGEMA TR, VISCO D (1999)**

Animal models of osteoarthritis.

In: An YH, Friedman J (Hrsg.): Animal Models in Orthopaedic Research, CRC Press, London; 349-367.

**OVLISEN K, KRISTENSEN AT, TRANHOLM M (2008)**

In vivo models of haemophilia - status on current knowledge of clinical phenotypes and therapeutic interventions.

Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia; 14: 248-259.

**PABINGER-FASCHING I, EICHINGER S, KYRLE PA (2004)**

Therapie der Hämophilie

In: Hämophiliegesellschaft Ö (Hrsg.): Hämophilie: die Antworten; ein Nachschlagewerk für Betroffene, Angehörige, Ärzte und Schwestern Eschig, Wien; 33-48.

**PABINGER-FASCHING I, HARTL HK (2004)**

Hämophilie.

In: Hämophiliegesellschaft Ö (Hrsg.): Hämophilie: die Antworten; ein Nachschlagewerk für Betroffene, Angehörige, Ärzte und Schwestern Eschig, Wien; 13.

**PABINGER-FASCHING I (2004)**

Blutungseignisse, Soforthilfe und Verletzungen.

In: Hämophiliegesellschaft Ö (Hrsg.): Hämophilie: die Antworten ; ein Nachschlagewerk für Betroffene, Angehörige, Ärzte und Schwestern Eschig, Wien; 26-33.

**PERL ER, KUMAZAWA T, LYNN B, KENINS P (1976)**

Sensitization of high threshold receptors with unmyelinated (C) afferent fibers.  
Prog Brain Res; 43: 263-277.

**PETTERSSON H, AHLBERG A, NILSSON IM (1980)**

A radiologic classification of hemophilic arthropathy.  
Clin Orthop Relat Res: 153-159.

**RAFFINI L, MANNO C (2007)**

Modern management of haemophilic arthropathy.  
British journal of haematology; 136: 777-787.

**RIPPEY JJ, HILL RR, LURIE A, SWEET MB, THONAR EJ, HANDELSMAN JE (1978)**

Articular cartilage degradation and the pathology of haemophilic arthropathy.  
S Afr Med J; 54: 345-351.

**ROCHA FA, ARAGAO AG, JR., OLIVEIRA RC, POMPEU MM, VALE MR, RIBEIRO RA (1999)**

Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats.

Inflamm Res; 48: 485-490.

**RODRIGUEZ-MERCHAN EC (1996)**

Effects of hemophilia on articulations of children and adults.

Clin Orthop Relat Res: 7-13.

**RODRIGUEZ-MERCHAN EC, RIBBANS WJ (1997)**

Editorial Comment. Symposium. Prevention and treatment of chronic hemophilic synovitis.

Clin Orthop; 343: 2.

**RODRIGUEZ-MERCHAN EC (1997)**

Pathogenesis, early diagnosis, and prophylaxis for chronic hemophilic synovitis.

Clin Orthop Relat Res: 6-11.

**RODRIGUEZ-MERCHAN EC (1998)**

The destructive capabilities of the synovium in the haemophilic joint.

Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia; 4: 506-510.

**RODRIGUEZ-MERCHAN EC (1999)**

Common orthopaedic problems in haemophilia.

Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia; 5 Suppl 1: 53-60.

**RODRIGUEZ-MERCHAN EC (2007)**

Haemophilic synovitis: basic concepts.

Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia; 13 Suppl 3: 1-3.

**ROOSENDAAL G, VIANEN ME, VAN DEN BERG HM, LAFEBER FP, BIJLSMA JW (1997)**

Cartilage damage as a result of hemarthrosis in a human in vitro model.

J Rheumatol; 24: 1350-1354.

**ROSENDAAL G, VIANEN ME, WENTING MJ, VAN RINSUM AC, VAN DEN BERG HM, LAFEBER FP, BIJLSMA JW (1998)**

Iron deposits and catabolic properties of synovial tissue from patients with haemophilia.

J Bone Joint Surg Br; 80: 540-545.

**ROSENDAAL G, VAN RINSUM AC, VIANEN ME, VAN DEN BERG HM, LAFEBER FP, BIJLSMA JW (1999a)**

Haemophilic arthropathy resembles degenerative rather than inflammatory joint disease.

Histopathology; 34: 144-153.

**ROSENDAAL G, VIANEN ME, MARX JJ, VAN DEN BERG HM, LAFEBER FP, BIJLSMA JW (1999b)**

Blood-induced joint damage: a human in vitro study.

Arthritis Rheum; 42: 1025-1032.

**ROSENDAAL G, TEKOPPELE JM, VIANEN ME, VAN DEN BERG HM, LAFEBER FP, BIJLSMA JW (1999c)**

Blood-induced joint damage: a canine in vivo study.

Arthritis Rheum; 42: 1033-1039.

**ROSENDAAL G, TEKOPPELE JM, VIANEN ME, VAN DEN BERG HM, LAFEBER FP, BIJLSMA JW (2000)**

Articular cartilage is more susceptible to blood induced damage at young than at old age.

J Rheumatol; 27: 1740-1744.

**ROSENDAAL G, LAFEBER FP (2003)**

Blood-induced joint damage in hemophilia.

Semin Thromb Hemost; 29: 37-42.

**ROSENDAAL G, LAFEBER FP (2006)**

Pathogenesis of haemophilic arthropathy.

Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia; 12 Suppl 3: 117-121.

**ROSENDAAL G, LAFEBER F (2007)**

Prophylactic treatment for prevention of joint disease in hemophilia--cost versus benefit.

N Engl J Med; 357: 603-605.

**ROY S, GHADIALLY FN (1966)**

Pathology of experimental haemarthrosis.

Annals of the rheumatic diseases; 25: 402-415.

**ROY S, GHADIALLY FN (1969)**

Synovial membrane in experimentally-produced chronic haemarthrosis.

Annals of the rheumatic diseases; 28: 402-414.

**SAFRAN MR, JOHNSTON-JONES K, KABO JM, MEALS RA (1994)**

The effect of experimental hemarthrosis on joint stiffness and synovial histology in a rabbit model.

Clin Orthop Relat Res: 280-288.

**SARIMO J, RANTANEN J, HEIKKILA J, HELTTULA I, HILTUNEN A, ORAVA S (2002)**

Acute traumatic hemarthrosis of the knee. Is routine arthroscopic examination necessary? A study of 320 consecutive patients.

Scand J Surg; 91: 361-364.

**SCHAIBLE HG, SCHMIDT RF (1983a)**

Responses of fine medial articular nerve afferents to passive movements of knee joints.

J Neurophysiol; 49: 1118-1126.

**SCHAIBLE HG, SCHMIDT RF (1983b)**

Activation of groups III and IV sensory units in medial articular nerve by local mechanical stimulation of knee joint.

J Neurophysiol; 49: 35-44.

**SCHAIBLE HG, GRUBB BD (1993)**

Afferent and spinal mechanisms of joint pain.

Pain; 55: 5-54.

**SCHAIBLE HG, RICHTER F (2004)**

Pathophysiology of pain.

Langenbecks Arch Surg; 389: 237-243.

**SCHAIBLE HG, DEL ROSSO A, MATUCCI-CERINIC M (2005)**

Neurogenic aspects of inflammation.

Rheum Dis Clin North Am; 31: 77-101, ix.

**SCHAIBLE HG (2006)**

Basic mechanisms of deep somatic tissue.

In: McMahon S, Koltzenburg M (Hrsg.): Wall and Melzack's textbook of pain, Elsevier, London; 621-633.

**SCHAIBLE HG, RICHTER F, EBERSBERGER A, BOETTGER MK, VANEGAS H, NATURA G, VAZQUEZ E, SEGOND VON BANCHET G (2009)**

Joint pain.

Exp Brain Res; 196: 153-162.

**SCHAIBLE HG, VON BANCHET GS, BOETTGER MK, BRAUER R, GAJDA M, RICHTER F, HENSELLEK S, BRENN D, NATURA G (2010)**

The role of proinflammatory cytokines in the generation and maintenance of joint pain.

Annals of the New York Academy of Sciences; 1193: 60-69.

**SCHARRER I, BRAY GL, NEUTZLING O (1999)**

Incidence of inhibitors in haemophilia A patients--a review of recent studies of recombinant and plasma-derived factor VIII concentrates.

Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia; 5: 145-154.

**SCOTT D (2006)**

Osteoarthritis and rheumatoid arthritis.

In: McMahon S, Koltzenburg M (Hrsg.): Wall and Melzack's textbook of pain, Elsevier, London; 653-667.

**SEGOND VON BANCHET G, BOETTGER MK, FISCHER N, GAJDA M, BRAUER R, SCHAIBLE HG (2009)**

Experimental arthritis causes tumor necrosis factor-alpha-dependent infiltration of macrophages into rat dorsal root ganglia which correlates with pain-related behavior. Pain; 145: 151-159.

**SHEN SM, FEINSTEIN DI, RAPAPORT SI (1973)**

The effects of injection of human factor VIII antibody into rabbits. Blood; 42: 509-521.

**SIMJEE SU, JAWED H, QUADRI J, SAEED SA (2007)**

Quantitative gait analysis as a method to assess mechanical hyperalgesia modulated by disease-modifying antirheumatoid drugs in the adjuvant-induced arthritic rat. Arthritis Res Ther; 9: R91.

**SOEUR R (1949)**

The synovial membrane of the knee in pathological conditions. J Bone Joint Surg Am; 31A: 317-340.

**SOUKIE JM, CIANFRINI C, JANCO RL, KULKARNI R, HAMBLETON J, EVATT B, FORSYTH A, GERAGHTY S, HOOTS K, ABSHIRE T, CURTIS R, FORSBERG A, HUSZTI H, WAGNER M, WHITE GC, 2ND (2004)**

Joint range-of-motion limitations among young males with hemophilia: prevalence and risk factors.

Blood; 103: 2467-2473.

**SPITZER A (1993)**

The significance of pain in children's experiences of hemophilia.

Clin Nurs Res; 2: 5-18.

**STEIN H, DUTHIE RB (1981)**

The pathogenesis of chronic haemophilic arthropathy.

J Bone Joint Surg Br; 63B: 601-609.

**STOKER DJ, MURRAY RO (1974)**

Skeletal changes in hemophilia and other bleeding disorders.

Semin Roentgenol; 9: 185-193.

**SWANTON MC (1959)**

Hemophilic arthropathy in dogs.

Lab Invest; 8: 1269-1277.

**TAJIMA T, YOSHIDA E, YAMASHITA A, OHMURA S, TOMITAKA Y, SUGIKI M, ASADA Y, MARUYAMA M (2005)**

Hemoglobin stimulates the expression of matrix metalloproteinases, MMP-2 and MMP-9 by synovial cells: a possible cause of joint damage after intra-articular hemorrhage.

J Orthop Res; 23: 891-898.

**TAN AH, MITRA AK, CHANG PC, TAY BK, NAG HL, SIM CS (2004)**

Assessment of blood-induced cartilage damage in rabbit knees using scanning electron microscopy.

J Orthop Surg (Hong Kong); 12: 199-204.



**TARNER IH, HARLE P, MULLER-LADNER U, GAY RE, GAY S (2005)**

The different stages of synovitis: acute vs chronic, early vs late and non-erosive vs erosive.

Best Pract Res Clin Rheumatol; 19: 19-35.

**TIKU ML, LIESCH JB, ROBERTSON FM (1990)**

Production of hydrogen peroxide by rabbit articular chondrocytes. Enhancement by cytokines.

J Immunol; 145: 690-696.

**TOMOKIYO K, TESHIMA K, NAKATOMI Y, WATANABE T, MIZUGUCHI J, NOZAKI C, NAKAGAKI T, MIYAMOTO S, FUNATSU A, IWANAGA S (2001)**

Induction of acquired factor IX inhibitors in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*): a new primate model of hemophilia B.

Thromb Res; 102: 363-374.

**TOREBJORK HE, LUNDBERG LE, LAMOTTE RH (1992)**

Central changes in processing of mechanoreceptive input in capsaicin-induced secondary hyperalgesia in humans.

J Physiol; 448: 765-780.

**TRANHOLM M, KRISTENSEN K, KRISTENSEN AT, PYKE C, ROJKJAER R, PERSSON E (2003)**

Improved hemostasis with superactive analogs of factor VIIa in a mouse model of hemophilia A.

Blood; 102: 3615-3620.

**TREDE RD, KENSHALO DR, GRACEY RH, JONES AK (1999)**

The cortical representation of pain.

Pain; 79: 105-111.

**TREDE RD, ROLKE R, ANDREWS K, MAGERL W (2002)**

Pain elicited by blunt pressure: neurobiological basis and clinical relevance.

Pain; 98: 235-240.

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM KC (2011)**

Faktor VIII.

Universitätsklinikum Ulm, Klinische Chemie: <http://www.uniklinik-ulm.de/struktur/institute/klinische-chemie/home/praeanalytik/untersuchungen-leistungsverzeichnis/efg/faktor-viii-aktivitaet.html>.

Zugriff: 12.02.2011

**VALENTINO LA, HAKOBYAN N, KAZARIAN T, JABBAR KJ, JABBAR AA (2004)**

Experimental haemophilic synovitis: rationale and development of a murine model of human factor VIII deficiency.

Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia; 10: 280-287.

**VALENTINO LA, HAKOBYAN N, RODRIGUEZ N, HOOTS WK (2007)**

Pathogenesis of haemophilic synovitis: experimental studies on blood-induced joint damage.

Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia; 13 Suppl 3: 10-13.

**VAN DIJK K, FISCHER K, VAN DER BOM JG, GROBBEE DE, VAN DEN BERG HM (2005)**

Variability in clinical phenotype of severe haemophilia: the role of the first joint bleed.

Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia; 11: 438-443.

**VOGT BA (2005)**

Pain and emotion interactions in subregions of the cingulate gyrus.

Nat Rev Neurosci; 6: 533-544.

**VON FREY M (1896)**

Ueber den Gebrauch von Reizhaaren.

Untersuchungen über die Sinnesfunctionen der menschlichen Haut. Erste Abhandlung: Druckempfindung und Schmerz.: 208-217.

**WANG L, ZOPPE M, HACKENG TM, GRIFFIN JH, LEE KF, VERMA IM (1997)**

A factor IX-deficient mouse model for hemophilia B gene therapy.

Proc Natl Acad Sci U S A; 94: 11563-11566.

**WATZKE H (2004)**

Gentherapie der Hämophilie.

In: Hämophiliegesellschaft Ö (Hrsg.): Hämophilie: die Antworten ; ein Nachschlagewerk für Betroffene, Angehörige, Ärzte und Schwestern Eschig, Wien; 49-52.

**WEN FQ, JABBAR AA, CHEN YX, KAZARIAN T, PATEL DA, VALENTINO LA (2002)**

c-myc proto-oncogene expression in hemophilic synovitis: in vitro studies of the effects of iron and ceramide.

Blood; 100: 912-916.

**WHITE GC, 2ND, ROSENDAAL F, ALEDORT LM, LUSHER JM, ROTHSCHILD C, INGERSLEV J (2001)**

Definitions in hemophilia. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis.

Thromb Haemost; 85: 560.

**WIJNBERGEN A (2007)**

Ratten - Spezielle Untersuchungsmethoden.

In: Fehr M, Sassenburg L, Zwart P (Hrsg.): Krankheiten der Heimtiere, Schlütersche, Hannover; 138-140.

**WIKIPEDIA (2011)**

Hämophilie.

Wikipedia: <http://de.wikipedia.org/wiki/H%C3%A4mophilie>.

Zugriff: 10.02.2011

**WINTERBOURN CC (1995)**

Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction.

Toxicol Lett; 82-83: 969-974.

**WOLF CR, MANKIN HJ (1965)**

The Effect of Experimental Hemarthrosis on Articular Cartilage of Rabbit Knee Joints.  
J Bone Joint Surg Am; 47: 1203-1210.

**WOOLF CJ (1983)**

Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity.  
Nature; 306: 686-688.

**YOUNG JM, HUDACEK AG (1954)**

Experimental production of pigmented villonodular synovitis in dogs.  
Am J Pathol; 30: 799-811.

**ZIMMERMANN M (1983)**

Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals.  
Pain; 16: 109-110.

## 9 ANHANG

### 9.1 Abkürzungsverzeichnis

#### Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AIA	Antigen-induzierte Arthritis
$\text{AlCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	Aluminiumchlorid
ANOVA	Analysis of Variance
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastin-Zeit
$\text{Bel}_{\text{links}}$	prozentuale Belastung der linken Hintergliedmaße
BIA	Blut-induzierte Arthropathie
D	mediolateraler Durchmesser des Kniegelenks
DPA	dynamisches plantares Ästhesiometer
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
HA	hämophile Arthropathie
HI-Virus	Humanes Immundefizienz-Virus
IASP	International Association for the Study of Pain
IL	Interleukin
I.R.	Infrarot
i.p.	intraperitoneal
LR	Schrittlänge, Abstand zwischen linkem und rechtem Pfotenabdruck
NaCl-LiHep	0,9-prozentige isotone Kochsalzlösung die zuvor in Lithium-Heprin Monovetten <sup>®</sup> geschwenkt wurde
NaCl-Lsg	0,9-prozentige isotone Kochsalzlösung
RL	Schrittlänge, Abstand zwischen rechtem und linkem Pfotenabdruck
S	Schwellung des linken Kniegelenkes
s.	siehe
SEM	Standardfehler (Standard Error of Mean)
Tab.	Tabelle
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
vs.	versus

---

VT	Vortest
Zellen	zelluläre Blutbestandteile

**Physikalische Größen**

cm	Zentimeter
g	Gramm
G	Gauge
ml	Milliliter
mm	Millimeter
min	Minute
µm	Mikrometer
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
s	Sekunde
U	Umdrehungen
Vol%	Volumenprozent
°C	Grad Celsius

## 9.2 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, auch wenn sie hier nicht namentlich genannt sind.

Herrn Professor Manfred Stangassinger danke ich für die gewissenhafte Durchsicht und Übernahme der Arbeit an die Tierärztliche Fakultät.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Michael Böttger für die Überlassung des Promotionsthemas und die umfangreiche Anleitung und Unterstützung sowohl bei der Durchführung als auch bei der Fertigstellung der Dissertation.

Herrn Professor Hans-Georg Schaible möchte ich für die Möglichkeit danken, die Versuche am Institut für Physiologie des Universitätsklinikums Jena durchführen zu können. Dabei gilt mein Dank auch Herrn Professor Rolf Bräuer für die Nutzungsmöglichkeit der Versuchstierhaltung des Pathologischen Instituts Jena.

Ein ganz besonders großes Dankeschön gilt Frau Renate Stöckigt für die unentbehrliche Hilfe bei der Versuchsdurchführung sowie die angenehme Zusammenarbeit und Hilfe bei der Lösung kleinerer und größerer Probleme.

Herrn Dr. Mieczyslaw Gajda vom Institut für Pathologie in Jena danke ich für die Begutachtung der histologischen Schnitte, sowie Frau Conny Hüttich für deren Anfertigung.

Danke an meine Kollegen vom Jenaer Institut für Physiologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Ein extra Dankeschön gilt dabei Frau Konstanze Ernst für die unkomplizierte Hilfe und mentale Unterstützung. Außerdem möchte ich meiner Doktoranden-Kollegin Diana Kümmel für ihre bereitwillige Unterstützung und Einarbeitung in der Anfangszeit danken.

Zudem möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre Unterstützung in allen Belangen bedanken. Ein großes Dankeschön gilt dabei meinem Papa Bernd Krucker für die Hilfe bei der Bewältigung von Problemen mit dem Word-Dokument.

Zuletzt möchte ich meinem Freund Florian Schmid danken für die Motivation und aufbauenden Worte während der Arbeit am Thema.