

**Justus-Liebig-Universität Gießen
Fachbereich Veterinärmedizin**

**Klinikum Veterinärmedizin
Klinik für Kleintiere (Chirurgie)**

**Bildgebende Verfahren in der Anwendung
am Skelett- und Bewegungsapparat des Hundes**

Habilitationsschrift
Zur Erlangung der Lehrbefugnis für die Fachgebiete

Klinische und experimentelle
bildgebende Verfahren in der Tiermedizin

Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dr. med. vet. Kerstin Heike Gräfin von Pückler von Schwichow

Gießen 2023

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 Bildgebende Verfahren in der Veterinärmedizin	1
1.1.1 Konventionelle Methoden	1
1.1.2 Weiterführende Verfahren	3
1.1.3 Nuklearmedizinische Verfahren	7
2 ZIELSETZUNG	11
3 ZUSAMMENFASSUNG DER EINZELSTUDIEN	14
3.1 Bildgebende Diagnostik am Skeletapparat des Hundes – unter besonderer Berücksichtigung von Wirbelsäule, Muskulatur und Gelenken	14
3.1.1 Magnetresonanztomografische Darstellung der Degeneration der lumbosakralen Bandscheibe bei Deutschen Schäferhunden	18
3.1.2 Morphometrie des lumbosakralen Übergangs im Röntgen beim Deutschen Schäferhund	21
3.1.3 Verlaufsuntersuchung der lumbalen Bandscheiben- und Facettengelenkveränderungen bei fünf Deutschen Schäferhunden	25
3.1.4 Muskulotendinopathie des <i>M. gastrocnemius</i> bei verschiedenen Hunderassen	29
3.1.5 Muskulotendinopathie des <i>M. gastrocnemius</i> bei einem Labrador Retriever	33
3.1.6 Die Rolle der Femurkopfgröße und -überdachung bei Hunden mit und ohne Hüftgelenkdysplasie	35
3.1.7 Magnetresonanztomografie des Kniegelenks nach Tibia Plateau Leveling Osteotomy	39
3.1.8 Abschließende Betrachtung	43
3.2 Bildgebende Diagnostik der Ellenbogengelenkdysplasie und ihre Herausforderungen	44
3.2.1 Röntgendiagnostik zur Beurteilung der Koronoidekrankung: Einfluss der Untersucherexpertise auf Variabilität und Sensitivität der Befunde	47
3.2.2 Diagnostische Wertigkeit von CT und MRT bei der Diagnose der Koronoidekrankung des Hundes	51
3.2.3 Einfluss der Schichtdicke bei der Beurteilung von CT-Untersuchungen in Hinblick auf die Ellenbogengelenkdysplasie mit besonderer Berücksichtigung der Koronoidekrankung	53
3.2.4 Computertomografie verbessert die diagnostische Genauigkeit bei schwierig einzustufenden Ellenbogengelenkdysplasie-Fällen	54
3.2.5 Computertomografische Morphologie des Ellenbogengelenks und Vorkommen der Ellenbogengelenkdysplasie beim Rotfuchs (<i>Vulpes vulpes</i>)	56
3.2.6 Abschließende Betrachtung	59
3.3 Darstellung von Stammzellen in der Magnetresonanztomografie	60

3.3.1 Markierung von Stammzellen und Makrophagen mit Gold- und Eisennanopartikeln	63
3.3.2 Markierung caniner mesenchymaler Stammzellen mittels Ultrasmall superparamagnetic iron oxides	66
3.3.3 Markierte canine mesenchymale Stammzellen im Defektmodell	70
3.3.4 Abschließende Betrachtung	74
4 DISKUSSION	75
5 ZUSAMMENFASSUNG/ SUMMARY	84
5.1 Zusammenfassung	84
5.2 Summary	88
6 LITERATURVERZEICHNIS	92
6.1. Allgemeine Literatur	92
6.2. Literatur Wirbelsäule, Muskulatur und Gelenke	99
6.3 Literatur Ellenbogengelenkdysplasie	105
6.4. Literatur Markierung von Zellen	108
7 KUMULATIVE PUBLIKATIONSLISTE	113
Originalarbeiten zum Kapitel 3.1	113
Originalarbeiten zum Kapitel 3.2	115
Originalarbeiten zum Kapitel 3.3	116
8 ANHANG	117
8.1 Abkürzungsverzeichnis	117
8.2 Danksagung	120
8.3 Eidesstattliche Erklärung	122

1 EINLEITUNG

In der vorliegenden kumulativen Habilitationsschrift wird der Einsatz unterschiedlicher bildgebender Verfahren am Stütz- und Bewegungsapparat in der Tiermedizin evaluiert.

Dabei gilt ein besonderes Augenmerk den Schnittbildverfahren Computertomografie und Magnetresonanztomografie.

Die Ergebnisse der Arbeit resultieren aus 15 Publikationen.

Nach der Einführung zur Entwicklung der bildgebenden Verfahren in der Tiermedizin und einer Gegenüberstellung der einzelnen Techniken werden die Zielstellungen der Schrift dargelegt.

Die zusammenfassende Diskussion erfolgt in Kapitel 4.

Die verwendete Literatur findet sich in Kapitel 6, die Originalpublikationen im letzten Abschnitt der kumulativen Arbeit.

1.1 Bildgebende Verfahren in der Veterinärmedizin

Im klinischen Alltag der Veterinärmedizin sind mittlerweile viele bildgebende Verfahren etabliert. Neben den Basismethoden wie Röntgen und Ultraschall werden vermehrt Schnittbildverfahren wie CT (Computertomografie) und MRT (Magnetresonanztomografie) genutzt. In größeren Diagnostikzentren finden außerdem nuklearmedizinische Verfahren (z.B. Szintigrafie, Single-Photonen-Emissions-Tomografie/SPECT) und vereinzelt auch Positronenemissionstomografie (PET) ihren Einsatz (Johnson, 2013).

1.1.1 Konventionelle Methoden

Röntgendiagnostik

Röntgen und Ultraschall werden im Allgemeinen zu den konventionellen Methoden der bildgebenden Verfahren gezählt (Meomartino et al., 2021). Der Röntgentechnik liegt die unterschiedliche Absorption der Röntgenstrahlung durch unterschiedliche Gewebe zugrunde. Während sich Röntgenröhren und Detektormaterialien seit der Entdeckung der Röntgenstrahlen stetig weiterentwickelt haben, bleibt die physikalische Grundlage des „Linienintegrals“ bestehen. Alle Dichtewerte werden entlang der Projektion aufsummiert und es entsteht ein zweidimensionales Bild aus einem dreidimensionalen Objekt (Bushberg, 2020).

Die Geschichte der Veterinärradiologie begann bereits kurz nach der Entdeckung der Röntgenstrahlen durch Wilhelm Conrad Röntgen im Jahr 1896. In der Folge wurden von Eder und Valenta Röntgenaufnahmen von Tieren angefertigt (Eder und Valenta, 1896). Die Technik entwickelte sich danach rasant weiter, wie z.B. durch die Erfindung der Coolidge-Röhre 1920. Der erste ausführliche deutschsprachige Text zur Veterinärröntgenologie wurde 1926 von Dr. Paul Henkels veröffentlicht. Das Buch trägt den Titel „Lehrbuch der veterinärmedizinischen Röntgenkunde“ und enthält

Kapitel zu den Grundlagen der Röntgentechnik, der Aufnahmetechnik, der pathologischen Anatomie und der Röntgentherapie bei Tieren. Im fünften Kapitel „Pathologische Anatomie des Tieres im Röntgenbilde“ werden unter anderem Erkrankungen der Knochen und der Gelenke sowohl bei Hund und Katze als auch bei Pferden besprochen (Henkels, 1926). Schon 1937 erschienen erste Beschreibungen zu Strahlenschäden beim Personal in der Veterinärröntgenologie (Wantz und Frick, 1937). In den Folgejahren wurden unterschiedliche Artikel zur Veterinärradiologie publiziert (Johnson, 2013).

Im Jahr 1962 wurde das „Journal of the American Veterinary Radiology Society“ ins Leben gerufen und erreichte den „Journal Status“. Ein weiteres Standardwerk, das in den 1960er-Jahren publiziert wurde, ist „Principles of Veterinary Radiography“ von Douglas und Williamson (1963).

Eine der ersten Publikationen, die sich mit der Bildgebung am Skelettsystem bei Kleintieren befasste, ist der Artikel „Some new diseases in dogs“ (Schnelle, 1935). Schnelle beschrieb die Diagnostik der Hüftgelenkdysplasie bei Hunden im Röntgenbild.

Schon bald wurde die Röntgendiagnostik in unterschiedlichsten Feldern der Tiermedizin angewandt. Die ersten Publikationen befassen sich meist mit einer anatomischen Beschreibung unterschiedlicher Strukturen wie z.B. der Röntgenmerkmale an der Vordergliedmaße beim Hund (Hare, 1959). Häufig kamen auch Kontrastmittel zur Darstellung von unterschiedlichen Gefäßen zum Einsatz, um diese erstmalig „in vivo“ zu beschreiben (Di Guglielmo et al., 1955). Auch zur optimalen Röntgentechnik am Skelettsystem wurden Empfehlungen gegeben (Riser et al., 1962). Schnell wurde sichtbar, dass auch besondere Erkrankungen, wie z.B. „Legg-Calve-Perthes“ oder Frakturen bei Hund und Katze, mithilfe der Röntgentechnik evaluierbar waren (Vaughan, 1966; Ljunggren, 1969).

In den 1980er-Jahren etablierte Fujifilm Medical Systems das erste digitale Röntgensystem in der Humanmedizin, das die Bezeichnung „Computed-Radiography (CR)-Folien-System“ erhielt (Mattoon, 2006). Schnell wurde die Technik in die Veterinärmedizin übernommen. Seit dieser Zeit hat sich die digitale Röntgentechnik rasant entwickelt (Mattoon, 2006). DR-Systeme (digitale Direktradiografie) folgten auf die CR-Systeme und wurden ebenfalls in die Veterinärmedizin übernommen (Mattoon, 2006). Einige Studien in der Veterinärmedizin haben die Bildqualität bzw. der Anwendbarkeit der digitalen Radiografie in der Veterinärmedizin untersucht (Bochmann et al., 2011; de Souza et al., 2022). Mit optimaler Nutzung kann die Strahlungsmenge und damit auch die Strahlenbelastung für Patient und Personal bei gleichzeitig guter Bildqualität signifikant reduziert werden. Neuere Entwicklungen beschäftigen sich mit der optimalen Nutzung der Röntgenstrahlung und der Optimierung der Bildqualität (Souza et al., 2022).

Sonografie

Die Ultraschall Diagnostik beruht auf der unterschiedlichen Reflexion der Ultraschallwellen an Grenzflächen und Strukturen in unterschiedlichen Geweben. Dabei spielen die Dichte und Rigidität des Gewebes eine große Rolle sowie die daraus resultierende Fortleitungsgeschwindigkeit. Diese beträgt in vielen Weichteilgeweben Werte zwischen 1,54 mm/μs und 1,64 mm/μs, während die Fortleitungsgeschwindigkeit in Knochengewebe 3–5 mm/μs beträgt. Genauso wie an der

Grenzfläche zu Luft bzw. Gas im Lungengewebe kommt es durch die veränderte Fortleitung zu unterschiedlichen Graden der Reflexion und Transmission der Wellen (Kremkau, 2019).

Wesentlich später als in der Röntgendiagnostik wurden die ersten Publikationen zum diagnostischen Einsatz des Ultraschalls veröffentlicht. Während in der Humanmedizin die ersten Ultraschallgeräte in den 1950er-Jahren zum Einsatz kamen und Real-time-Ultraschall schon wenige Jahre später möglich war, nahm diese Technik erst in den 1980er-Jahren eine besondere Stellung in der Tiermedizin ein (Johnson, 2013). Im Jahr 1988 fassten Lamb und Mitarbeiter die „ersten 21 Jahre Ultraschall in der Veterinärmedizin“ zusammen (Lamb et al., 1988). Einzelne Studien zum Einsatz der Sonografie in der orthopädischen Diagnostik wurden seit Beginn der Ultraschallnutzung in der Tiermedizin publiziert (Kramer et al. 1997). Aufgrund der relativ geringen Ortsauflösung in den Bildern bei den ursprünglichen Geräten konnten einige Fragestellungen erst mit der Etablierung neuerer Systeme beantwortet werden. So berichteten Kramer et al. bereits 1997 vom Einsatz der Sonografie in der orthopädischen Diagnostik beim Kleintier und stellten in weiteren Publikationen die Vorteile der Modalität bei der Bildgebung am Bewegungsapparat bei Kleintieren vor (Kramer et al., 1997). In den Fokus rückt das Verfahren in der Kleintiermedizin jedoch besonders in den letzten Jahren, besonders im Bereich der Sehnen- und Muskeldiagnostik, aber auch am Schulter- und Kniegelenk (Cook 2016, Entani et al., 2022).

Neuere Techniken in der Ultraschalldiagnostik erlauben die Darstellung der Sehnen- und Muskel- elastizität mit sog. „Elastografien“ (Piccionello et al., 2018; Del Signore et al., 2020).

1.1.2 Weiterführende Verfahren

Computertomografie

Die Entwicklung der CT-Untersuchung bildet einen Meilenstein in der Human- und Veterinärmedizin. Die grundsätzliche Funktionsweise der CT beruht auf der unterschiedlichen Absorption der Röntgenstrahlen durch das untersuchte „Objekt“. Jede Struktur besitzt einen charakteristischen linearen Schwächungskoeffizienten, der sich aus der physikalischen Dichte und Ordnungszahl des Materials ergibt (Kalender, 2011; Bushberg et al., 2020).

Nachdem 1971 die ersten Prototypen zur Bilderstellung genutzt wurden, konnten erste Publikationen zum Einsatz in der Veterinärmedizin erst Anfang der 1980er-Jahre veröffentlicht werden. Die ersten Untersuchungen von Marincek und Mitarbeitern (1980) beschrieben den Einsatz beim Verdacht auf neoplastische Veränderungen. In Paris wurde in einer Tierklinik 1989 der erste Computertomograf in der Veterinärmedizin installiert. Die Technik etablierte sich in den anschließenden Jahren rasch (Johnson, 2013).

Zunächst stand der Einsatz am Zentralen Nervensystem im Fokus, doch schon bald wurden die Vorteile der CT-Bildgebung bei der Untersuchung weiterer Regionen offensichtlich und Standardprotokolle wurden etabliert (Johnson, 2013).

Aufgrund der rasanten Weiterentwicklung der CT-Technologie in der Medizin können wir mittlerweile auf Mehrschicht-Tomografen mit hoher räumlicher Auflösung zurückgreifen. Sie ermöglichen

es, auch sehr kleine oder sehr große Objekte in der Veterinärmedizin detailliert und gleichzeitig effizient darzustellen (Johnson, 2013). In der Veterinärmedizin resultiert aus den sehr unterschiedlichen Patienten eine hohe Variabilität der Untersuchungsparameter. Nach und nach wurden in der Veterinärmedizin Hardware-Elemente entwickelt, die auch die partielle Untersuchung großer Patienten, wie z.B. von Pferden, ermöglichen. Hierzu gehören Untersuchungstische, auf denen Pferde liegend oder stehend positioniert werden können, um Untersuchungen der Gliedmaßen oder der Kopfregion in der CT anzufertigen (Epperly und Whitty, 2020). Aus der Mehrschicht-Technik ergibt sich außerdem die Möglichkeit zur weiteren Bearbeitung der Daten z.B. zur dreidimensionalen Darstellung von Strukturen oder zum dreidimensionalen Druck (De Armond et al., 2022).

Die CT kann am Achsenskelett zur genaueren Evaluation knöcherner Strukturen eingesetzt werden. Im Bereich der Weichteilgewebe zeigt dagegen die MRT eine deutlich höhere diagnostische Sensitivität. Dennoch wird die CT z.B. bei chondrodystrophen Hunden auch bei der Abklärung von Bandscheibenvorfällen eingesetzt (Sharp et al., 1995; Olby et al., 2000; da Costa und Samii, 2010). Am appendikulären Skelett kommt die CT häufig zur Diagnostik von Ellenbogenveränderungen beim Hund zum Einsatz. Hier ist die Abklärung einer Coronoidpathologie als eine der häufigsten Indikationen zu nennen. Aber auch alle anderen Gelenke können mithilfe hochauflösender CT in der Kleintiermedizin beurteilt werden (Reichle et al., 2000; Hebel et al., 2021).

Weitere Gelenke wie z.B. das Hüftgelenk können in einer CT weiterführend untersucht werden (Wang et al., 2005; Ginja et al., 2009). In der orthopädischen Diagnostik wird zur Verbesserung des Weichteilkontrasts, abhängig von der Fragestellung, eine intravenöse oder intraartikuläre Applikation von jodhaltigen Kontrastmitteln durchgeführt (Ohlert et al., 2007).

Magnetresonanztomografie

Die Entstehung magnetresonanztomografischer Bilder basiert auf der Feststellung, dass Wasserstoffprotonen (im Körper in unterschiedlichen Verbindungen z.B. in Wasser und Fett enthalten) ein eigenes magnetisches Moment durch ihren Spin erzeugen (Pooley, 2005; Bushberg et al. 2020). Dieses magnetische Moment wird durch die Untersuchung im Tomografen, der selbst ein großes Magnetfeld darstellt, beeinflusst. Durch die Zugabe von Hochfrequenzimpulsen können die magnetischen Momente ausgelenkt und deren Rückkehr in den ursprünglichen Zustand als spezifisches Signal unter Abgabe von Energie detektiert werden. Kontrast der Bilder und Darstellung der Organe werden durch unterschiedlich lange (oder kurze) Messzeiten beeinflusst und in Form von „Untersuchungssequenzen“ abgebildet (Gavin, 2011).

Die Grundlagen der Magnetresonanztomografie wurden schon im 19. Jahrhundert von Nikola Tesla durch die Beschreibung des magnetischen Spins geschaffen. Im Jahr 1937 beschrieb Isidor Rabi eine genauere Methode zur Messung des Spins und der Orientierung von Atomkernen bzw. Protonenspins (Rabi, 1937). In Anerkennung seiner Arbeit erhielt er 1944 den Nobelpreis für Physik (Giunta und Mainz, 2020).

Neben der Anwendung der Methode in der Chemie begann Raymon Damadian mit Messungen in lebenden Organismen. Er entdeckte die ersten Abweichungen der Messung in verändertem Gewebe (Damadian, 1971).

Paul Lauterbur und Peter Mansfield arbeiteten unabhängig voneinander an der Verbesserung der klinischen Anwendung. Hierfür erhielten Sie den Nobelpreis für Medizin im Jahr 2003. Die ersten erfolgreichen Untersuchungen in der Humanmedizin erfolgten zu Beginn der 1970er-Jahre (Damadian, 1971; Damadian et al., 1973; Lauterbur und Foster, 1980).

MR-Tomografen können anhand ihrer Feldstärke in drei Kategorien unterteilt werden: Bei einer Magnetfeldstärke von weniger als 0,4 Tesla wird der Tomograf als „Niederfeldgerät“ bezeichnet. Niederfeldsysteme zeichnen sich durch deutlich geringere Kosten in Anschaffung und Wartung aus (Konar und Lang, 2011).

Magnetfeldstärken zwischen 0,5 und 1 Tesla gelten als mittelstarke Magnetfelder. Tomografen, die eine Magnetfeldstärke von 1 Tesla oder mehr benutzen, werden als Hochfeldtomografen bezeichnet (Bushberg et al. 2020). Letztere bieten aufgrund der hohen Feldstärke häufig die Möglichkeit, eine hohe Ortsauflösung zu generieren und arbeiten mit schnellen Gradientensystemen. Dies führt allgemein zu einer verbesserten Bildqualität aufgrund eines hohen SNR (Signal-zu-Rausch-Verhältnis) und einer hohen zeitlichen Auflösung (Pooley, 2005). Zusätzlich können bei hoher Magnetfeldstärke besondere Untersuchungssequenzen zum Einsatz kommen, die zum einen eine besonders detaillierte Darstellung anatomischer Verhältnisse ermöglichen und zum anderen Daten zu funktionellen Besonderheiten generieren. Nachteil der Hochfeldsysteme sind die relativ hohen Kosten sowie die deutlich größere Artefaktanfälligkeit (Hayashi et al., 2004; Konar und Lang, 2011).

Oft bieten für die Tiermedizin etablierte Systeme spezifisch auf die Tiermedizin abgestimmte Spulen und Sequenzen an. Die Nachteile im Vergleich zum Hochfeldsystem liegen neben der geringeren Bildqualität besonders in den längeren Untersuchungszeiten (Konar und Lang, 2011). Die Bildqualität kann durch eine erhöhte Schichtdicke kompensiert werden, dies führt jedoch zu einer reduzierten räumlichen Auflösung und besonders bei Schichtdicken von ca. 5 mm müssen vermehrt Schichtdickenartefakte in Kauf genommen werden (Konar und Lang, 2011). Alternativ können die Akquisitionszeiten verlängert werden. Dies führt jedoch häufig zu einer sehr langen Untersuchungsdauer, die in Konflikt mit der zur Untersuchung notwendigen tiefen Sedation bzw. Narkose steht (Konar und Lang, 2011).

Die ersten Veröffentlichungen zur klinischen Anwendung der MRT in der Tiermedizin stammen aus den späten 1980er- und frühen 1990er-Jahren und fokussierten sich besonders auf die Anwendung in der Neurologie. Kraft und Mitarbeiter beschrieben 1989 die MR-Anatomie des Hundehirns und Dennis berichtete 1993 von möglichen Anwendungsbereichen der MRT in der Tiermedizin (Kraft et al., 1989; Dennis, 1993). Im Jahr 1992 wurde am Animal Health Trust in Newmarket, Großbritannien, einer der ersten in der Tiermedizin installierten MR-Tomografen in Betrieb genommen (Johnson, 2013). Das Gerät wies eine Feldstärke von 0,5 Tesla auf. Im Jahr 2001 wurde das erste eigens für die Tiermedizin hergestellte Niederfeldsystem installiert (Johnson, 2013).

Karkkainen und Mitarbeiter veröffentlichten 1993 ihre Ergebnisse zur Anwendung der MRT in der Diagnostik von Lendenwirbelsäulenerkrankungen beim Kleintier. Sie untersuchten 11 Patienten und 3 gesunde Tiere mithilfe eines 0,02-T- und 0,04-T-Niederfeld-MR-Tomografen in T1- und T2-gewichteten Sequenzen. Schon in dieser frühen Studie konnte festgestellt werden, dass der Verlust des Nucleus-pulposus-Signals der Bandscheiben als Anzeichen einer Degeneration interpretiert

tiert werden kann (Karkkainen et al., 1993). Ein großes Einsatzgebiet der MRT in der Kleintiermedizin ist die Darstellung des Zentralen Nervensystems, während in der Pferdemedizin besonders die Abbildung des appendikulären Skeletts zum Einsatz kommt (Greco et al., 2022).

Die MRT wird in der Human- und in der Tiermedizin als Goldstandard zur Diagnose von Bandscheibenveränderungen betrachtet. Hier ist besonders die hervorragende Kontrastauflösung der MRT (im Vergleich zur CT) hilfreich. So ist außerdem die Detektion intraspinaler Läsionen möglich (Dennis, 2011).

Während die CT aufgrund der deutlichen Dichteunterschiede besonders zur Darstellung der knöchernen Strukturen geeignet ist, kann die MRT vor allem Weichteilstrukturen darstellen. Voraussetzung für eine Darstellung eines Gewebes in der MRT ist das Vorhandensein von Wasserstoffprotonen. Physiologische Knochenkortikalis zeigt sich in der MRT hypointens („schwarz“), da keine Wasserstoffprotonen enthalten sind (Gavin, 2011; King, 2021; Brown, 2022).

Bei entzündlichen Veränderungen der knöchernen Strukturen oder subchondralen Ödemen, z.B. bei traumatischen Veränderungen, zeigt sich der ödematöse Anteil hyperintens („weiß“). Hieraus resultiert die besondere Sensitivität der MRT für aktive bzw. akute Knochenläsionen (Gavin, 2011). Die MRT ist daher die Methode der Wahl zur Darstellung der nichtknöchernen Anteile, z.B. an Schulter, Ellenbogen oder Kniegelenk. Besonders zur Darstellung von Knorpelläsionen und angrenzenden subchondralen Ödemen, z.B. im Rahmen einer enchondralen Ossifikationsstörung, ist die MRT geeignet. Dies beschrieben van Bree und Mitarbeiter für die Osteochondrose des caninen Schultergelenks (van Bree et al., 1993). Untersuchungen zur MRT-Darstellung des caninen Kniegelenks betrachteten zum einen die Abbildung des kranialen Kreuzbandes und zum anderen die Detektion von Meniskusläsionen. Letztere sind in der Arthroskopie lediglich eingeschränkt beurteilbar und die MRT bildet daher die Standardmethode zur Beurteilung dieser Strukturen (Martig et al., 2006).

Auch frühe degenerative Gelenkerkrankungen und osteophytäre Zubildungen können in der MRT mit einer hohen Genauigkeit festgestellt werden (D'Anjou et al., 2008). Nolte-Ernsting und Mitarbeiter (1996) berichteten, dass die MRT bei experimentellen Osteoarthritiden der Röntgenuntersuchung überlegen ist. Zusätzlich eignen sich besonders fettunterdrückte Sequenzen zur Darstellung subchondraler Knochenveränderungen (Winegardener et al., 2007). In den letzten Jahren hat sich die Anwendung der MRT-Untersuchung in der Orthopädie weiterentwickelt. Verfahren, die die Wasserdiffusion und -Verteilung innerhalb des Gelenkknorpels oder der Menisken bei Hunden darstellen können, wurden etabliert (Ruoff et al., 2016). Weitere Untersuchungen schließen die Darstellung von Biomaterialien und Implantaten in Gelenkstrukturen mit ein (Egan et al., 2018). Funktionelle Verfahren, die die Oxygenierung oder Diffusion eines Gewebes darstellen können, werden immer häufiger in der Neurologie und Orthopädie genutzt. Diese Verfahren stehen am Übergang der reinen morphologischen zur funktionellen Abbildung der Strukturen (Glover, 2011).

Zur Darstellung des Knorpels kommen zusätzlich zu den genannten Verfahren vermehrt Spezialanwendungen zum Einsatz.

Die MRT bietet die Möglichkeit, durch Darstellung der T2-Relaxationswerte (T2-mapping) Diffusionseigenschaften von Gelenkknorpel aufzuzeigen. Untersuchungen wurden am Ellenbogen- und Kniegelenk beim Hund durchgeführt (Wucherer et al., 2012; Matsui et al., 2017). Eine weitere

Möglichkeit intakten Gelenkknorpel darzustellen, ist die kontrastmittelverstärkte Perfusion (dGEMRIC – delayed gadolinium enhanced Magnetic Resonance imaging of cartilage) (Wucherer et al., 2012).

Diese Techniken werden in aktuellen Studien vermehrt zur Darstellung von regenerativen Prozessen eingesetzt: Ying et al. (2019) beschrieben das „T2-mapping“ nach experimenteller Applikation mesenchymaler Stammzellen in die Bandscheibe bei einer Gruppe von Hunden (Ying et al., 2019).

1.1.3 Nuklearmedizinische Verfahren

Die Nuklearmedizin nutzt ein radioaktives Isotop zur Diagnostik. Hierbei erhält der Patient ein Radiopharmakon oral oder als Injektion oder Inhalation (Bushberg, 2020). Da die unterschiedlichen nuklearmedizinischen Verfahren den Zerfall des Radiopharmakons darstellen, werden die Bilder als „Emissions-Bilder“ bezeichnet, die vom Patienten „ausgehen“. Da die Verteilung des Radiopharmakons von Durchblutung und Stoffwechselprozessen abhängig ist, werden die nuklearmedizinischen Verfahren zur „funktionellen Bildgebung“ gezählt. Die Bilder geben Informationen zu Stoffwechselzuständen, teils in spezifischen Körperregionen, ohne eindeutige anatomische Darstellung (Daniel und Berry, 2006; Bushberg, 2020).

Die Entdeckung der Grundlagen der Nuklearmedizin fand kurz nach Röntgens Entdeckung der „x-Strahlen“ statt. Im Labor von Henri Becquerel führte Marie Curie die ersten Versuche zu der von ihr so benannten „Radioaktivität“ durch (Myers und Wagner, 1974). Aufgrund ihrer Beobachtungen wurden weitere Forschungsprojekte zu den physikalischen Grundlagen radioaktiver Elemente durchgeführt. Bald schon gab es Vorschläge, die Strahlung therapeutisch zu nutzen (Myers und Wagner, 1974).

Der Physiker Hevesy zeigte 1923 als erster die Verteilung von radioaktivem Blei in Pflanzen. Viele Studien zur Verwendung und weiteren Untersuchung von Radon und Radium wurden in der folgenden Zeit durchgeführt. Schon 1931 erarbeitete Lawrence das Prinzip des „Zyklotron“ und eröffnete damit die Möglichkeit zur künstlichen Herstellung radioaktiver Stoffe. In der Folge wurden erste Versuche zur Applikation von Jod-131 an Tieren durchgeführt. Im Jahr 1934 entdeckte die Gruppe um Fermi die selektive Anreicherung von Jod im Schilddrüsengewebe von Menschen. Die Entstehung von Technetium-99m wurde zum ersten Mal 1938 beschrieben (Segre und Seaborg, 1938). Im Jahr 1971 schließlich fasste Winchell eine erste Übersicht zu „Radioactive tracers in Nuclear Medicine“ zusammen (Myers und Wagner, 1974).

Szintigrafie

In die Veterinärmedizin findet die Nuklearmedizin durch den Einsatz der Szintigrafie am Skelett des Pferdes Einzug. Die Darstellung des Knochenstoffwechsels, z.B. bei Verdacht auf eine Fissur an den distalen Gliedmaßen, stellt den Übergang von der rein morphologischen zur funktionellen Bildgebung dar (Quiney et al., 2018). Die Darstellung der Schilddrüse war eine der ersten Applika-

tionen in der Kleintiermedizin. Diese wird weiterhin bei der Diagnose und Therapie der felines Hyperthyreose genutzt (Daniel und Neelis, 2014).

Bei der Diagnostik von Schilddrüsenveränderungen kommt in der Regel Technetium-99m zum Einsatz. Die Therapie findet, analog zur Humanmedizin, mithilfe von Jod-131 statt. Weitere Radionuklide wie z.B. Indium, Thallium und Krypton können kombiniert mit Radiopharmazeutika für unterschiedliche klinische Fragestellungen und Organe angewendet werden (Daniel und Berry, 2006). Da die szintigrafischen Bilder keine detaillierten Informationen zur Morphologie bieten, kann eine Kombination mit den Schnittbildverfahren MRT und CT sinnvoll sein (LeBlanc, 2007). In der orthopädischen Diagnostik wird Technetium-99m in Kombination mit Radiopharmazeutika (z.B. Diphosphonaten) eingesetzt. Diese können die Osteoblastenaktivität und damit den Knochenstoffwechsel aufzeigen. Veränderungen bei vermehrtem Umbau (Stress) oder nach Traumata, Entzündungen oder Neoplasien können so in einem Stadium festgestellt werden, in dem noch keine deutlichen morphologischen Veränderungen in anderen Verfahren vorliegen. Eine vermehrte Anreicherung des Radiopharmakon wird dabei als „Hot Spot“ bezeichnet (Krzemiński et al. 2004). Die Szintigrafie dient aufgrund ihrer hohen Sensitivität vor allem als Screeningmethode. Van Bruggen (2010) beschreibt die vergleichende Betrachtung der Szintigrafie bei Hunden mit Verdacht auf eine Ellenbogengelenkdysplasie und Hunden ohne klinisch feststellbare orthopädische Erkrankung. Die Studie zeigt bei allen erkrankten Hunden eine vermehrte Anreicherung von ^{99m}Tc -methylendiphosphonat (^{99m}Tc -MDP) und lässt darauf schließen, dass die Szintigrafie wichtige Zusatzinformationen, besonders bei Hunden mit unklarer klinischer Evaluation, bieten kann (Van Bruggen et al., 2010). Die Szintigrafie bietet außerdem die Möglichkeit zur Markierung von Stammzellen. In einer Studie, die die intraossäre Applikation bei Pferden untersucht hat, wurden allogene Stammzellen mit Technetium-Pertheneat ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) markiert und erfolgreich dargestellt (Barberini et al., 2018).

In der Kleintiermedizin zeigten Spriet et al. (2015) an einem Hundemodell unterschiedliche Applikationswege mesenchymaler Stammzellen und deren Anreicherung im Lebergewebe. Hierfür kam eine Markierung mit Technetium-99m (^{99m}Tc)-hexamethyl-propylene-aminoxim (^{99m}Tc -HMPAO) zum Einsatz. Da systemisch applizierte markierte Stammzellen im Lungengewebe verbleiben, wird eine lokale Applikation empfohlen (Spriet et al., 2015).

Single-Photon-Emissionscomputertomografie (SPECT) und Positronen-Emissions-Tomografie (PET)

Weitere nuklearmedizinische Verfahren, die in der Tiermedizin vereinzelt diagnostisch und meist experimentell zum Einsatz kommen, sind die Single-Photon-Emissionscomputertomografie (SPECT) und die Positronen-Emissions-Tomografie (PET) (LeBlanc und Peremans, 2014).

In der Humanmedizin spielt die SPECT besonders bei der Diagnostik von Metastasen oder neurodegenerativen Veränderungen eine Rolle. Die SPECT ermöglicht die Darstellung von Dopamin-Transportern und wird daher mit ^{123}I -FP-CIT (^{123}I -N- ω -fluoropropyl-2 β -carbomethoxy-3 β -(4-iodophenyl)nortropane) besonders zur Darstellung von neurologischen Veränderungen verwendet (Vermeire et al, 2011).

In der PET kommt sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin besonders die ^{18}F -FDG oder auch 2-Fluor-2-desoxy-D-glucose (Fluordesoxyglucose) zum Einsatz. Das Glucose-Analogon wird von Zellen mit hoher metabolischer Aktivität angereichert. Dies gilt besonders für Gehirn und Herz oder Entzündungen und Neoplasien (LeBlanc et al., 2009; Lawrence et al., 2010; Seiler et al., 2015).

In einer Kombination mit Natrium bietet es die Möglichkeit zur Darstellung von Knochenveränderungen, insbesondere Neoplasien und deren Metastasen (Spriet et al., 2019). Zusätzlich kann es in der Lahmheitsdiagnostik verwendet werden (Hoskinson und Tucker, 2001; McLarty et al., 2021). Eine experimentelle Studie zur Bandscheibendegeneration am Hundemodell konnte mithilfe von 9-(4-[^{18}F]-fluoro-3-hydroxymethylbutyl)-Guanin zeigen, dass bei der experimentell induzierten Bandscheibendegeneration Stammzellen bis zu 3 Wochen nach Implantation in die Bandscheibe aktiv waren. Danach konnte keine spezifische Aktivität mehr festgestellt werden (Hang et al., 2017).

Auch in der Diagnostik der Ellenbogengelenkdysplasie wurden erste Schritte in der PET-Darstellung gemacht: Eine Studie von McLarty (2021) zeigte bei 12 Hunden mit Ellenbogenlahmheiten eine genauere Detektion der Läsionen in der PET im Vergleich zur CT-Untersuchung. Die Studie fasst zusammen, dass die PET besonders bei unklarer Lahmheit genaue Informationen liefert und gleichzeitig dazu geeignet ist, die klinische Signifikanz von CT-Befunden einzuordnen sowie den Verlauf der Erkrankung und Therapieerfolge sichtbar zu machen (McLarty et al., 2021).

2 ZIELSETZUNG

Die vorliegende kumulative Schrift zeigt auf, wie die rasante technische Weiterentwicklung der bildgebenden Verfahren in der Tiermedizin während der letzten 100 Jahre zu vielseitigen Einsatzmöglichkeiten, besonders im Bereich der Schnittbildverfahren, geführt hat. Sie gibt eine Übersicht zu unterschiedlichen Einsatzmöglichkeiten bildgebender Verfahren am Skelettsystem in der Tiermedizin mit besonderem Augenmerk auf den mit am häufigsten betroffenen Strukturen wie den lumbosakralen Übergang, Muskulatur und Ellenbogen-, Knie- und Hüftgelenken. Hier finden besonders Erkrankungen Beachtung, die aufgrund des relativ häufigen Auftretens beim Kleintier oder aufgrund der hohen Rassespezifität beim Hund eine besondere Stellung im klinischen Alltag einnehmen. Neben den Herausforderungen in der Diagnostik dysplastischer und degenerativer Veränderungen wird unter Einsatz bildgebender Verfahren die Basis für ein genaueres Verständnis der Erkrankungen geschaffen. Der letzte Abschnitt der Arbeit soll aufzeigen, wie bildgebende Verfahren dazu eingesetzt werden können, die Therapie degenerativer oder dysplastischer Erkrankungen am Skelettsystem zu verbessern, indem die Nachverfolgung von Stammzellen nach deren Applikation näher betrachtet wird.

Die erste Studie befasst sich mit der Frage nach der rassespezifischen und frühen Degeneration der lumbosakralen Bandscheibe beim Deutschen Schäferhund im Vergleich zu anderen Rassen. Es soll geklärt werden, ob eine rassespezifische Frühdegeneration auftritt, die durch spezifische morphologische Kriterien erklärt werden kann. Zusätzlich wird der Einsatz der Magnetresonanztomografie zur Beurteilung des Degenerationsgrades an einer großen Studienpopulation beschrieben.

Die ergänzenden Untersuchungen beim Deutschen Schäferhund betrachten morphologische Röntgenkriterien am lumbosakralen Übergang im Vergleich zu anderen Rassen. Mithilfe von Heritabilitätsschätzungen wird die rassespezifische Konformation der kaudalen Lendenwirbelsäule beim Deutschen Schäferhund beschrieben.

Eine zusätzliche Dimension zeigt sich bei Verlaufsuntersuchungen zur Bandscheibenveränderung bei 5 Deutschen Schäferhunden in einem Zeitraum von 5 Jahren.

Die Muskulotendinopathie des M. gastrocnemius wurde in der Vergangenheit als Differenzialdiagnose bei Lahmheit der Hintergliedmaße häufig nicht berücksichtigt. Es bestand zudem die Annahme, dass es sich um eine Erkrankung handelt, die besonders bei Hütehunden auftritt. Mithilfe der Magnetresonanztomografie ist es möglich, die Erkrankung besonders exakt zu diagnostizieren. Die vorliegenden Studien konnten die Muskulotendinopathie bei weiteren Hunderassen feststellen und beschreiben ein einheitliches magnetresonanztomografisches Bild bei Hütehunderassen und anderen Hunden.

In einer weiteren Studie werden röntgenologische Besonderheiten des Femurkopfes bei Hunden unterschiedlicher Rassen mit unterschiedlichen Graden der Hüftgelenkdysplasie beschrieben. Die Studie zeigt den besonderen Stellenwert der Femurkopfgröße und der Überdachung des Femurkopfes bei Hunden mit und ohne Hüftgelenksdysplasie. Auch hier spielt der Einfluss der Rasse auf

die einzelnen Parameter eine signifikante Rolle. Diese Befunde können auf eine Relevanz der Parameter bei der Entwicklung der Dysplasie hindeuten.

Oft stellt sich die Frage nach einer optimalen Darstellung der artikulären und periartikulären Strukturen auch nach einem operativen Eingriff am Kniegelenk. Eine Studie des Abschnitts zeigt auf, welche Besonderheiten bei einer MRT-Untersuchung des Kniegelenks nach einer Umstellungsosteotomie besonders im Hinblick auf Implantat-bedingte Artefakte zu berücksichtigen sind. Welche Sequenz ist zur Darstellung spezifischer anatomischer Strukturen unter diesen besonderen Herausforderungen besonders geeignet? Welche Strukturen sind beurteilbar und welche könnten ggf. im Anschluss an eine Operation nicht beurteilt werden?

Im Kapitel 3.2 wird die bildgebende Diagnostik der Ellenbogengelenkdysplasie mit Fokus auf der Koronoiderkrankung betrachtet. Welche besonderen Herausforderungen sind beim Einsatz von Röntgen und CT zu beachten und können morphologische Befunde einen Hinweis auf die Funktion des Ellenbogengelenks bringen?

Einen besonderen Stellenwert bei der Diagnostik der Koronoiderkrankung hat die Befundung durch unterschiedliche Auswertende. Die erste Studie beschreibt unterschiedliche Sensitivitäten und Spezifitäten von Auswertenden mit unterschiedlichen Erfahrungsgraden.

Anschließend werden die Schnittbildverfahren MRT und CT in Hinblick auf ihre diagnostische Genauigkeit betrachtet.

Die dritte Untersuchung beschäftigt sich mit einem der wichtigsten technischen Parameter in der CT-Diagnostik der Ellenbogengelenkdysplasie und untersucht die Frage nach einer minimal notwendigen Schichtdicke, um eine möglichst genaue Diagnose in Hinblick auf die canine Koronoidpathologie zu erreichen. Gleichzeitig soll geklärt werden, ob größere Schichtdicken ebenfalls zur Diagnostik geeignet sind.

Eine weitere Untersuchung stellt die Frage nach der Genauigkeit der Röntgenuntersuchung am Ellenbogengelenk bei besonders herausfordernden Zuchtröntgenfällen. Die Studie soll darlegen, ob es Parameter im Röntgenbild gibt, die als Grundlage für eine Entscheidung zu einer ergänzenden CT-Untersuchung dienen können. Gleichzeitig soll geklärt werden, welche CT-Befunde eine anhand der Röntgenbilder getroffene falsch positive oder falsch negative Entscheidung erklären.

Die abschließende Untersuchung betrachtet computertomografisch-morphologische Unterschiede des Ellenbogengelenks beim Rotfuchs im Vergleich zum Haushund. Treten Anzeichen einer dysplastischen Ellenbogenveränderung auch bei Rotfüchsen auf und gibt es morphologische Unterschiede, die das gehäufte Auftreten der Ellenbogengelenkdysplasie bei mittelgroßen Hunden erklären können?

Die in den vorangegangenen Kapiteln untersuchten Erkrankungen an der Wirbelsäule, den Muskeln und Gelenken sind aufgrund der ursächlichen Degeneration des Bewegungsapparats und der erblichen Komponente häufig nur symptomatisch behandelbar oder Therapien werden dazu eingesetzt, die Auswirkungen oder das Fortschreiten der Prozesse zu reduzieren. Als eine vielversprechende Möglichkeit zur Therapie degenerativer Erkrankungen wird der Einsatz mesenchymaler Stammzellen diskutiert. Im letzten Abschnitt soll untersucht werden, ob bildgebende Verfahren bei der Erforschung der Stammzelltherapie im klinischen Kontext am Patienten dazu geeignet

sind, die Zellen möglichst lange und effektiv zu verfolgen. Welche Kontrastmittelkonzentrationen und welche Sequenzen besonders dazu geeignet sind, dieses Ziel zu erreichen, wird hier dargestellt.

Die vorliegende Arbeit hat das Ziel, durch ihren praxisnahen Ansatz über die vorliegenden Untersuchungen Impulse für den Einsatz moderner bildgebender Verfahren im klinischen Alltag zu geben. Die Erkenntnisse aus vorangegangenen In-vitro-Untersuchungen sollen in die Anwendung überführbar gemacht werden und eine Unterstützung in der alltäglichen orthopädischen Diagnostik und Therapie darstellen.

3 ZUSAMMENFASSUNG DER EINZELSTUDIEN

3.1 Bildgebende Diagnostik am Skelettsystem des Hundes – unter besonderer Berücksichtigung von Wirbelsäule, Muskulatur und Gelenken

Studie 1

Amort, K.H., Ondreka, N., Rudorf, H., Stock, K.F., Distel, O., Tellhelm, B., Kramer, M., Wigger, A. (2012):

MRI-imaging of lumbosacral intervertebral disc degeneration in clinically sound German Shepherd dogs compared to other breeds.

Veterinary Radiology and Ultrasound; 53(3): 289–295.

DOI:10.1111/j.1740-8261.2011.01903

Studie 2

Ondreka, N., **Amort, K.H.**, Stock, K.F., Tellhelm, B., Klumpp, S.W., Kramer, M., Schmidt, M.J. (2013):

Skeletal morphology and morphometry of the lumbosacral junction in German shepherd dogs and an evaluation of the possible genetic basis for radiographic findings.

The Veterinary Journal; 196(1): 64–70.

DOI: 10.1016/j.tvjl.2012.07.015

Studie 3

Paulus, Ch., Brinkmeier, H.S., Jährig, R.A., Schaub, K., Büttner, K., Kramer, M., **von Pückler, K.** (2022):

Verlaufsuntersuchung der lumbalen Bandscheiben- und Facettengelenkveränderungen bei 5 Deutschen Schäferhunden.

Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere; 50: 400–410.

DOI: 10.1055/a-1967-9782

Studie 4

Kaiser, S.M., Harms, O., Konar, M., Staudacher, A., Langer, A., Thiel, C., Kramer, M., Schaub, S., **von Pückler, K.H.** (2016):

Clinical, radiographic, and magnetic resonance imaging findings of gastrocnemius musculotendinopathy in various dog breeds.

Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology; 29: 515–552.

DOI: 10.3415/VCOT-16-01-0015

Studie 5

Fiedler, A.M., **Amort, K.H.**, Bokmeyer, J., Kramer, M. (2013):

Musculotendinopathy of the gastrocnemius muscle in a Labrador Retriever. A case report.

Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere; 45: 349–354.

DOI: 10.1055/s-0038-1623720

Studie 6

Pilli, M., Seyrek Intas, D., Etikan, I., Yigitgor, P., Kramer, M., Tellhelm, B., **von Pückler, K.** (2023):
The Role of Femoral Head Size and Femoral Head Coverage in Dogs with and without Hip Dys-
plasia.

Veterinary Science; 10(2): 120.

DOI:10.3390/vetsci10020120

Studie 7

Feichtenschlager, Ch., Gerwing, M., Failing K., Peppler, Ch. Kása, A. Kramer, M., von **Pückler, K.H.** (2018):

Magnetic Resonance Imaging Assessment of Intra-Articular Structures in the Canine Stifle Joint
after Implantation of a Titanium Tibial Plateau Levelling Osteotomy Plate.

Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology; 31: 261–272.

DOI:10.1055/s-0038-1647248

Einleitung

Veränderungen am Skelettsystem sind ein häufiger Vorstellungsgrund in der alltäglichen Kleintiermedizin. Aufgrund der Häufigkeit und der langfristigen Auswirkungen für die Patienten haben degenerative Veränderungen der Wirbelsäule und des appendikulären Skeletts eine große Bedeutung (O'Neill et al., 2021).

Bei großen Hunderassen tritt an der Wirbelsäule gehäuft das Cauda-equina-Syndrom auf. Die Erkrankung führt zu einem frühzeitigen Ausscheiden aus der Arbeit als Gebrauchshund und geht mit schwerwiegenden neurologischen Ausfällen einher (Denny et al., 1982; Jaggy et al., 1987). Die degenerative lumbosakrale Stenose ist der häufigste Grund für das klinische Bild eines Cauda-equina-Syndroms. Oft tritt die Bandscheibendegeneration in Kombination mit anderen degenerativen Prozessen auf, die z.B. die Hypertrophie oder Arthrose der Facettengelenke beinhalten sowie Spondylosen oder Hypertrophie von Bändern im Bereich des lumbosakralen Übergangs (Denny et al., 1982; Jaggy et al., 1987). Da Deutsche Schäferhunde zu den am häufigsten betroffenen Hunden gehören, wurde eine genetische Komponente vermutet (Moore et al., 2001; Seiler et al., 2002). Um eine mögliche Aussage über prädisponierende Faktoren treffen zu können, wurde in der Vergangenheit insbesondere die Konformation der knöchernen Strukturen (z.B. der Facettengelenke oder des lumbosakralen Winkels) morphologisch untersucht (Oliver et al., 1978; Schmidt und Lang, 1993; Rossi et al., 2004). Die Weichteilstrukturen des Achsenskeletts konnten erst mit Einsatz der Magnetresonanztomografie genauer erforscht werden (Seiler et al., 2003). Im Gegensatz zu den in diesem Rahmen eingesetzten Verfahren wie Röntgen oder Computertomografie bietet die Magnetresonanztomografie die Möglichkeit zur indirekten Darstellung der Wasser- und Proteoglykankonzentration der Bandscheibe (Niemelainen et al., 2008; Marinelli et al., 2009). Die Reduktion des Wassergehalts des Nucleus pulposus spricht für eine degenerative Veränderung der Bandscheibe (Seiler et al., 2003).

Mit Verbesserung der Technik in den bildgebenden Verfahren hat in den letzten Jahrzehnten auch die spezifische Darstellung von extra- und intraartikulären Weichteilstrukturen am appendikulären Skelett an Bedeutung gewonnen (Meomartino et al., 2021).

Eine Erkrankung des Bewegungsapparats, die sich auf Veränderungen der Muskel- und Sehnenstrukturen bezieht, ist die Muskulotendinopathie des M. gastrocnemius. In vorangegangenen Studien wurde diese Veränderung des M. gastrocnemius und seines Ursprungs vor allem bei Hütehunden beschrieben (Stahl et al., 2010). Vom Ursprung des M. gastrocnemius und dem muskulotendinösen Übergang dehnt sich die Erkrankung nach distal aus. Als Ursachen wurden Verletzungen im Sinne von vollständigen und teilweisen Avulsionen diskutiert (Reinke et al., 1982; Permattei, 1986; Ridge und Owen, 2005). Aufgrund der reaktiven Weichteilveränderungen ist die MRT das Mittel der Wahl bei der Darstellung klinisch relevanter Läsionen (Stevens et al., 1999; Stahl et al., 2010).

Die wohl größte Bedeutung, auch in Hinblick auf die Hundezucht, kommt der Hüftgelenkdysplasie zu, da sie eine der häufigsten Ursachen für eine Lahmheit der Hintergliedmaßen beim Hund ist. Es besteht ein deutlicher genetischer Hintergrund der Erkrankung (Binversie et al., 2022). Aufgrund einer Gelenklockerheit und fehlender Ausformung des Hüftgelenks entsteht vor allem bei großen

Hunden eine degenerative Erkrankung. Ihre Diagnostik ist limitiert, da keine verlässliche Methode existiert, die schon bei Jungtieren eine Aussage zur späteren Entwicklung einer Dysplasie zulässt (Adams et al., 1998; Merca et al., 2020). Zur Zuchtselektion werden in den meisten Fällen Röntgenuntersuchungen des Beckens von ausgewachsenen Hunden im ventrodorsalen Strahlengang als phänotypische Screeningverfahren eingesetzt (Flückiger, 2007; Kyriazis und Prassinou, 2016). Eine möglichst genaue Bestimmung der Röntgenmerkmale dysplastischer Hüftgelenke ist dabei von besonderer Bedeutung.

Eine weitere vorwiegend degenerative Erkrankung mit großer klinischer Relevanz ist die Ruptur des kranialen Kreuzbandes am Kniegelenk, die bei Hunden (besonders großen Rassen) einer der häufigsten Gründe für eine Lahmheit der Hintergliedmaßen darstellt (Johnson et al., 1994). Die (meist degenerative) Zerreißung der Fasern führt bei Belastung zu einer kranialen Subluxation der Tibia. Es gibt eine Vielzahl an chirurgischen Therapieoptionen, eine der am häufigsten eingesetzten Methoden ist die „Tibial Plateau Leveling Osteotomy“ (TPLO) (Fitzpatrick et al., 2010; Gati-neau et al., 2011). Die Meniskopathie stellt die häufigste Begleiterkrankung eines Kreuzbandrisses dar und tritt bei bis zu 13% der Patienten auch nach einer Operation auf (Pacchiana et al., 2003; Thieman et al., 2006; Cook et al., 2010). Daher kann trotz Eingriffs eine Verbesserung des Gesundheitszustands ausbleiben (Case et al., 2008).

Eine wenig invasive Methode, um eine Meniskusvernderung zu diagnostizieren, stellt die MRT dar (Oei et al., 2007; Blond et al., 2008). Bisher war die MRT-Diagnostik bei Patienten nach Umstellungsosteotomie durch Metallartefakte (Suszeptibilitätsartefakte) limitiert (Argraeves et al., 2011). Mittlerweile sind TPLO-Implantate aus Titanlegierungen verfügbar. Titan ist besonders in Hinblick auf das seltenere Vorkommen von Implantatinfektionen überlegen und erlaubt gleichzeitig eine verbesserte Untersuchung in der MRT (Pieske et al., 2008, Sultans et al., 2008). Die hier vorgestellte Studie zeigt auf, unter welchen Umständen intrartikulre Strukturen beurteilt werden könnten.

3.1.1 Magnetresonanztomografische Darstellung der Degeneration der lumbosakralen Bandscheibe bei Deutschen Schäferhunden

Studie 1

Amort, K.H., Ondreka, N., Rudolf, H., Stock, K.F., Distel, O., Tellhelm, B., Kramer, M., Wigger, A. (2012):

MRI-imaging of lumbosacral intervertebral disc degeneration in clinically sound German Shepherd dogs compared to other breeds.

Veterinary Radiology and Ultrasound; 53(3): 289–295.

Das Ziel der hier vorgestellten Studie war die Untersuchung der lumbalen Bandscheibenkonformation sowie umliegender Strukturen am lumbosakralen Übergang bei jungen Deutschen Schäferhunden im Vergleich zu anderen mittelgroßen Hunderassen. In einer vorangegangenen Studie wurde die Magnetresonanztomografie eingesetzt, um ein Graduierungssystem zur Bandscheibendegeneration zu etablieren (Seiler et al., 2003). Diese Untersuchung schloss vier Hunde ein und verglich die Einteilung der Bandscheibendegeneration mit histopathologischen Untersuchungen. In der hier vorgestellten Studie wurde diese Graduierung übernommen und zusätzlich die Auswertung prädisponierender Faktoren eingeschlossen. Die Untersuchungsergebnisse aus der Gruppe der Deutschen Schäferhunde wurden mit Untersuchungen von Hunden anderer mittelgroßer bis großer Rassen verglichen.

In die Studie flossen die Daten aus den magnetresonanztomografischen Untersuchungen von 110 Deutschen Schäferhunden (40 weibliche, 70 männliche) und 47 Hunden aus anderen Rassen (26 weibliche, 21 männliche) ein. Alle Hunde waren zum Zeitpunkt der Untersuchungen klinisch unauffällig.

Das mittlere Alter der Deutschen Schäferhunde und der Hunde aus anderen Rassen war vergleichbar (kein statistisch signifikanter Unterschied). Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren zwei Drittel der Hunde jünger als 18 Monate.

Die Hunde wurden in Allgemeinanästhesie in einem 1 Tesla Magnetresonanztomografen untersucht (Philips Intera Gyroscan 1.0, Philips Healthcare, Hamburg, Deutschland). Die Untersuchung schloss sagittal und transversal orientierte T2-gewichtete(w)-Spinecho-Sequenzen und T1-gewichtete Gradienten-Echo-Sequenzen in dorsaler Orientierung von der Höhe des 4. Lendenwirbels (L4) bis zum Os sacrum (S1-3) ein.

Nach der Untersuchung wurden die Bilder anonymisiert und die Patientendaten mit Nummern chiffriert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit einer medizinischen Software (Philips DICOM Viewer 2.4) und wurde zweimal durchgeführt. Die Messungen beinhalteten die Graduierung des Degenerationsgrades der Bandscheiben von L5 bis S1 anhand der o.g. etablierten Methode (Seiler et al., 2003). In transversal orientierten Bildern wurde mithilfe einer „Region of interest“ (ROI) die Ausdehnung der Bandscheibe und des Nucleus pulposus festgehalten. Gleichzeitig wurden die Signalintensitäten der Areale bestimmt, um eine semiquantitative Aussage zum Wassergehalt

zu ermöglichen. Weitere festgehaltene Parameter schlossen die Orientierung der Wirbelkörper L7 und S1 sowie das mögliche Vorliegen von Stufenbildungen ein (nach Schmidt und Lang, 2008). Das Vorliegen von (kongenitalen) Malformationen (z.B. Osteochondrose, lumbosakraler Übergangswirbel) wurde zudem mit „0“ (abwesend) und „1“ (vorhanden) kodiert. Die Daten wurden mittels einer Statistiksoftware (SAS 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2009) – unter Berücksichtigung einer Varianzanalyse (General Linear Model, SAS, 9.2) und einer Pearsons-Korrelation (CORR, SAS, 9.2) – ausgewertet. Zusätzlich wurden multiple multivariate Modelle entwickelt. Die Überprüfung der Parameter „Rasse“, „Geschlecht“ und „Alter“ erfolgte mittels Least Square Means. Außerdem wurden Regressionen angewandt und Residualanalysen zu den Modellen durchgeführt. Auch der Zusammenhang zwischen Graduierungssystem und morphologischen Parametern wurde betrachtet. Ein P-Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

Basierend auf der Einteilung der Degenerationsgrade der lumbosakralen Bandscheibe wurde beim Deutschen Schäferhund am häufigsten eine Einstufung in Grad 3 und Grad 4 vorgenommen. Der Mittelwert lag bei 2,81. Es gab keinen Zusammenhang zwischen dem Degenerationsgrad der lumbosakralen Bandscheibe und dem der kranial gelegenen Bandscheiben. In der Kontrollgruppe war der überwiegende Teil der lumbosakralen Bandscheiben mit einem Grad von 2 degeneriert, mit einem Mittelwert von 2,48. Der Unterschied im Degenerationsgrad zwischen der Gruppe der Deutschen Schäferhunde und der Gruppe der anderen Hunde war statistisch signifikant ($p < 0,003$).

Bei Deutschen Schäferhunden war kein Einfluss des Geschlechts auf den Degenerationsgrad feststellbar. Bei Nichtschäferhunden zeigte sich bei weiblichen Hunden ein signifikant höherer Grad der Degeneration auf Höhe L5–L6.

Die Messungen zur Ausdehnung der Bandscheibe und zur Signalintensität ergaben, dass die Tiere der Nichtschäferhunde-Gruppe eine signifikant geringere Bandscheibenfläche aufwiesen. Männliche Tiere aus der Gruppe der Deutschen Schäferhunde zeigten größere Bandscheibenflächen als weibliche. Dieser Unterschied bestand in der Kontrollgruppe nicht. Zusätzlich bestand ein signifikanter Alterseinfluss und in beiden Gruppen (Deutsche Schäferhunde und andere Rassen) zeigte sich eine positive Korrelation des Alters der Tiere mit der Größe der Bandscheibenflächen ($p < 0,001$). Die Degeneration der Bandscheibe kann in Zusammenhang mit einer beginnenden Herniation zu einer Vergrößerung der Fläche führen.

Die lumbosakrale Bandscheibe zeigte beim Deutschen Schäferhund eine geringe Signalintensität. Gleichzeitig wies die Signalintensität bei älteren Tieren einen signifikanten ($p < 0,001$) Rückgang auf.

Weder Rasse noch Geschlecht oder Alter hatten einen signifikanten Einfluss auf die Fläche des Nucleus pulposus.

In Hinblick auf die Signalintensität des Nucleus pulposus konnten signifikante Unterschiede erhoben werden: Der Nucleus pulposus der lumbosakralen Bandscheibe zeigte bei Deutschen Schäferhunden ein signifikant geringeres Signal ($p < 0,002$) als bei den Hunden der Vergleichsgruppe. Zwar war kein geschlechtsspezifischer Unterschied der Signalintensität feststellbar, aber bei allen Hunden zeigt der Nucleus pulposus einen Signlrückgang bei steigendem Alter ($p < 0,001$).

Es bestand erwartungsgemäß eine negative Korrelation der Signalintensität der Bandscheibe (gesamt) und des Nucleus pulposus mit dem Degenerationsgrad der Bandscheibe, da Bandscheiben mit höherem Degenerationsgrad nach Seiler et al. (2003) in der Regel eine geringere Signalintensität aufweisen.

Bei Deutschen Schäferhunden konnte eine signifikant größere (1,8-fach) lumbosakrale Stufenbildung festgestellt werden als bei der Vergleichsgruppe.

Bei 4,5% der Deutschen Schäferhunde konnte eine Osteochondrose des Os sacrum festgestellt werden. Bei 11% der Deutschen Schäferhunde und bei 8,8% der Vergleichshunde wurde ein lumbosakraler Übergangswirbel diagnostiziert.

Die Signalintensitätsmessung der gesamten Bandscheibenfläche (Anulus fibrosus und Nucleus pulposus gemeinsam) schien konstantere Werte zu ergeben. Dies kann mit der schlechten Abgrenzbarkeit des Nucleus pulposus bei degenerativ veränderten Bandscheiben in Zusammenhang stehen. Die Messung und Beurteilung der Signalintensität wurde durch Schichtdickenartefakte und ein teilweise reduziertes Signal-zu-Rausch-Verhältnis beeinflusst. Eine genauere Signalbestimmung war durch rechnerische Normalisierung dieser Rohwerte möglich.

Eine weitere Besonderheit der Bandscheibe beim Deutschen Schäferhund im Vergleich zu anderen Rassen ist das Verhältnis des Anulus fibrosus zum Nucleus pulposus: Hier konnte ein relativ großer Anulus fibrosus festgestellt werden. Dies kann ggf. eine schlechtere Perfusion des Nucleus pulposus bedingen.

Zusammenfassend konnten bei jungen und klinisch unauffälligen Deutschen Schäferhunden mit einem mittleren Alter von 17,5 Monaten signifikante Unterschiede hinsichtlich der Bandscheibenkonformation und -degeneration im Vergleich zu Hunden anderer Rassen festgestellt werden.

Es zeigten sich ein höherer lumbosakraler Degenerationsgrad, reduzierte Signalintensitäten, größere Bandscheibenflächen sowie Geschlechterunterschiede und eine überdeutliche lumbosakrale Stufenbildung bei Deutschen Schäferhunden. Ein signifikanter Zusammenhang der lumbosakralen Bandscheibendegeneration mit der Degeneration der übrigen kranial gelegenen Bandscheiben wurde nicht beobachtet. Dies unterstützt die These vorangegangener Studien, die von einer isolierten und prädisponierten Degeneration im lumbosakralen Übergang ausgehen (Burger und Lang, 1993; Seiler et al., 2003). Eine Rassedisposition zur lumbosakralen Bandscheibendegeneration ist die wahrscheinlichste Ursache. Morphologische Kenngrößen zur frühen Erkennung prädisponierter Tiere konnten in der vorliegenden Studie nicht erhoben werden.

Hinsichtlich der Methoden sind weitere Normalisierungen der Messungen besonders in Hinblick auf die Signalintensität notwendig. Inter- und intraobserver Vergleiche der Methoden sollten validiert werden.

3.1.2 Morphometrie des lumbosakralen Übergangs im Röntgen beim Deutschen Schäferhund

Studie 2

Ondreka, N., **Amort, K.H.**, Stock, K.F., Tellhelm, B., Klumpp, S.W., Kramer, M., Schmidt, M.J. (2013):

Skeletal morphology and morphometry of the lumbosacral junction in German shepherd dogs and an evaluation of the possible genetic basis for radiographic findings.

The Veterinary Journal; 196(1): 64–70.

In vorangegangenen Studien konnte festgestellt werden, dass z.B. lumbosakrale Übergangswirbel oder eine Osteochondrose des Os sacrum prädisponierend für eine Bandscheibendegeneration beim Deutschen Schäferhund sind (Lang et al., 1992; Morgan et al., 1993; Damur-Djuric et al., 2006). Die genetischen Hintergründe dieser Veränderungen wurden nur in einzelnen Studien, z.B. am lumbosakralen Übergangswirbel (Wigger et al., 2009), betrachtet. Weitere Informationen zur Erbllichkeit morphologischer Besonderheiten fehlen. Eine vergleichende Untersuchung zur Morphologie des lumbosakralen Übergangs bei unterschiedlichen Hunderassen kann bei der weiteren Identifizierung prädisponierender Faktoren hilfreich sein.

Daher sollten in der hier vorgestellten Studie röntgenanatomische Besonderheiten des lumbosakralen Übergangs von Deutschen Schäferhunden mit denen anderer Rassen verglichen werden. Die Vererbung der festgestellten morphologischen Röntgenkriterien beim Deutschen Schäferhund wurden denen einer Kontrollgruppe gegenübergestellt.

Mithilfe der Pedigree-Daten zum Deutschen Schäferhund konnte eine potenzielle genetische Basis der Charakteristika überprüft werden.

In einer retrospektiven Untersuchung wurden die Röntgenbilder klinisch unauffälliger Hunde verglichen. Die anonymisierten und für die Rasse geblindeten Röntgenbilder wurden von einer Residentin und (in Konsens) von einem Diplomate des European College for Veterinary Diagnostic Imaging ausgewertet. Die Auswertung umfasste neun qualitative binäre Merkmale und 17 quantitative Merkmale. Die Merkmale wurden nach den Methoden vorangegangener Publikationen beurteilt (Wright, 1980; Feeney und Wise, 1981; Walla, 1986; Morgan und Bailey, 1990; Mattoon und Koblik, 1993; Schmid und Lang, 1993; Scharf et al., 2004).

Binäre Merkmale enthielten: Osteochondrose des Sakrum, lumbosakrale Übergangswirbel, Spondylosis deformans (SPON7/1 und SPON6/7), lumbosakrale Spondylarthrose (ARTH), Sklerose der kranialen Endplatte am Sakrum (SCLER), Verdichtungen im Zwischenwirbelspalt (O-DISC) oder Wirbelkanal (OCAN) und eine reduzierte Abgrenzbarkeit der ventralen Sakrumdachbegrenzung.

Quantitative Merkmale enthielten: lumbosakrale Stufenbildung (STEP), Durchmesser des lumbosakralen Zwischenwirbelspalts (IVS), die Länge und Höhe der Wirbelkörper L6 bis S1, die Höhe

des Wirbelkanals an sechs Lokalisationen (jeweils kraniale und kaudale Endplatte von L6, L7 und Sakrum).

Mögliche Einflüsse von Körpergröße und Körpergewicht sollten minimiert werden. Daher wurden anatomische Referenzpunkte der individuellen Röntgenbilder genutzt, um eine einheitslose Größe zu kreieren, die einen Vergleich zwischen den unterschiedlichen Hunden ermöglicht.

Die Röntgenmerkmale konnten mithilfe des Programms SAS statistisch untersucht werden (SAS version 9.2, SAS Institute). Varianzanalysen wurden zur Darstellung von Unterschieden in Hinblick auf die Gruppen, das Geschlecht und das Alter durchgeführt. Multivariate Regressionsmodelle hinsichtlich der unterschiedlichen Einflüsse wurden erstellt. Dabei wurden lumbosakrale Übergangswirbel als Faktor berücksichtigt.

Die morphologischen Ergebnisse wurden mithilfe des GENMOD-Verfahrens (General Linear Model) errechnet. Die Varianzanalyse fand ebenfalls mittels SAS-Verfahren (General Linear Model) statt. Ergebnisse mit einem $p < 0,05$ wurden als signifikant betrachtet.

Zur Bestimmung der Effekte der sieben morphologischen und 17 morphometrischen Merkmale wurden Modelle erstellt, die das Geschlecht und das Alter der Hunde als lineare Variablen integrieren. Zufällige genetische Einflüsse wurden in diesem Modell ebenfalls berücksichtigt. Es wurden sowohl univariate als auch multivariate Schätzungen zu den einzelnen genetischen Parametern erstellt. Für die Heritabilitäten und genetischen sowie residualen Korrelationen wurden ebenfalls Modelle entwickelt.

In die Studie wurden 733 Deutsche Schäferhunde (392 männlich, 341 weiblich) aufgenommen. Das mittlere Alter der Tiere betrug 15 Monate (9–145 Monate). Der Großteil der Hunde war jünger als 18 Monate (90%).

Die Kontrollgruppe bestand aus 334 Hunden aus 46 Rassen (190 männlich, 144 weiblich). Das mittlere Alter der Tiere betrug 29 Monate (10–94 Monate). Weniger als 50% der Tiere waren jünger als 18 Monate.

Bei den Deutschen Schäferhunden wurden häufiger als bei Vergleichshunden Osteochondrosen des Sakrum (10,1% versus 5,7%) diagnostiziert ($p = 0,013$). Zusätzlich bestanden häufiger lumbosakrale Übergangswirbel (6,8% versus 4,2%) (keine Signifikanz).

Signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) zwischen den beiden Gruppen waren vor allem bei Arthrose, Sklerose, Verdichtungen im Zwischenwirbelspalt oder Wirbelkanal mit häufigerem Auftreten bei den Deutschen Schäferhunden festgestellt. Bei männlichen Tieren wurden häufiger Sklerosen festgestellt als bei weiblichen und bei weiblichen traten häufiger Spondylosen auf ($p < 0,05$). Die lumbosakrale Stufenbildung kam bei den Deutschen Schäferhunden deutlich häufiger vor als in der Vergleichsgruppe ($p < 0,001$). Auch die absoluten Messwerte für die Stufe drückten dies aus.

Der Zwischenwirbelspalt war signifikant breiter bei den Deutschen Schäferhunden ($0,54 \pm 0,14$) als bei den Kontrollhunden ($0,48 \pm 0,12$). Auch die Wirbelkörperdimensionen zeigten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Auffällig war die insgesamt reduzierte Höhe des Wirbelkanals bei den Deutschen Schäferhunden. Besonders am lumbosakralen Übergang war dieser Befund betont. Unabhängig von der Messme-

thode zeigte sich der lumbosakrale Winkel beim Deutschen Schäferhund größer ($p < 0,001$) als bei den Hunden der Vergleichsgruppe.

Für die genetische Analyse standen die Zuchtdaten von 572 Deutschen Schäferhunden zur Verfügung (298 männlich, 274 weiblich). Die Erblichkeit der unterschiedlichen morphologischen Merkmale lag zwischen 0,22 und 0,64. Es bestanden zusätzliche negative Korrelationen einzelner Merkmale wie z.B. zwischen der Osteochondrose am Os sacrum und lumbosakralen Übergangswirbeln.

In Hinblick auf die Varianz einzelner Komponenten zeigte sich beim Deutschen Schäferhund eine niedrige bis moderate Erblichkeit von $h^2 = 0,25$ für den lumbosakralen Zwischenwirbelspalt (IVS) und ein Wert von $h^2 = 0,34$ für die Stufe. Bei der Bestimmung der Wirbelkörperdimensionen zeigten sich für die normalisierten Werte Heritabilitäten von $h^2 = 0,05$ – $0,43$. Die Messungen des lumbosakralen Wirbelkanals zeigten moderate bis hohe Heritabilitäten von $0,31$ – $0,72$. Die Messungen des Wirbelkanals zeigten sich in den residualen Korrelationen positiv korreliert. Besonders die Wirbelkanalmessungen auf Höhe von S1 und S3 zeigten eine residuale positive genetische Korrelation von $r = 0,95$.

Die Ergebnisse der Untersuchung zeigen, dass ein deutlicher Unterschied morphologischer Merkmale am lumbosakralen Übergang des Deutschen Schäferhundes im Vergleich zu anderen Rassen besteht. Osteochondrose und besondere Merkmale am Os sacrum traten in der Gruppe der Deutschen Schäferhunde fast doppelt so häufig auf wie bei anderen Hunden. Auch die Prävalenz des lumbosakralen Übergangswirbels war deutlich höher, jedoch ohne statistische Signifikanz. Ein relevanter Einfluss auf das Entstehen einer degenerativen lumbosakralen Stenose ist daher fraglich. Ein häufigeres Auftreten beider Befunde wurden bereits von vorangegangenen Arbeitsgruppen beobachtet (Lang et al., 1992; Hanna, 2001; Glyde et al., 2004; Michal et al., 2004; Mathis et al., 2009).

Die Skelettmorphologie beim Deutschen Schäferhund unterscheidet sich von der anderer Rassen. Dies wird z.B. im niedrigeren Durchmesser des Wirbelkanals des Deutschen Schäferhundes am lumbosakralen Übergang ersichtlich: Das Ergebnis kann auf eine kongenitale Malformation im Sinne einer Wirbelkanalstenose hindeuten. Zusätzlich zeigt sich beim Deutschen Schäferhund eine abrupte Verengung des Wirbelkanals auf Höhe des lumbosakralen Zwischenwirbelspalts. Auch wurde beim Deutschen Schäferhund eine größere Stufenbildung als bei anderen Hunden festgestellt und Stufen traten doppelt so häufig auf. Die Stufenbildung wurde von vorangegangenen Studien in Zusammenhang mit dem Auftreten einer degenerativen lumbosakralen Stenose gebracht (Schmid and Lang, 1993; Suwankong et al., 2006).

Die besondere Morphologie des lumbosakralen Übergangs beim Deutschen Schäferhund wird durch die oben genannten Merkmale „reduzierte Wirbelkanaldimension“, „lumbosakraler Winkel“ und „Stufenbildung“ beschrieben.

Es ist anzunehmen, dass bei Rassen mit kongenitalen Wirbelkanalverengungen eine reduzierte Toleranz im Hinblick auf zusätzliche Verengungen, z.B. im Rahmen einer Bandscheibenvorwölbung, besteht und häufiger klinische Symptome entstehen. In diesem Zusammenhang ist die frühe Degeneration der Bandscheibe von besonderem Interesse, da früh klinisch relevante Befunde vorliegen können.

Die Untersuchungen der Heritabilitäten der hier beschriebenen morphologischen Veränderungen konnten zeigen, dass die Schätzwerte für die Heritabilität der Osteochondrose des Os sacrum und der lumbosakralen Übergangswirbel hoch waren ($> 0,5$). Die Schätzwerte für die Heritabilitäten der Stufenbildung und der Verengung des Wirbelkanals waren als mittel- bis hochgradig zu betrachten.

Aufgrund der geringen Studienpopulation sind die Werte der Heritabilitäten jedoch zurückhaltend zu interpretieren. Eine erneute Untersuchung der Befunde anhand einer größeren Population wäre sinnvoll. Dennoch sind die Ergebnisse der Studie dazu geeignet, die Besonderheit des Phänotyps beim Deutschen Schäferhund zu beschreiben.

Die Limitationen sind zum einen im retrospektiven Studiendesign zu sehen, zum anderen in der eher kleinen vorselektierten Gruppe der Deutschen Schäferhunde und Vergleichshunde, die in die genetische Untersuchung einfließen konnten. Zusätzlich zeigten die Deutschen Schäferhunde im Mittel ein geringeres Alter als die Hunde der Vergleichsgruppe. Dennoch waren in der Gruppe der Deutschen Schäferhunde degenerative Veränderungen häufiger zu beobachten.

Zusammenfassend konnte beim Deutschen Schäferhund im Vergleich zu anderen Rassen eine abweichende Konformation des lumbosakralen Übergangs festgestellt werden. Diese zeichnet sich besonders durch eine mögliche „primäre“ lumbosakrale Stenose aus. Weitere Veränderungen, die als zusätzliche Prädisposition für eine degenerative lumbosakrale Stenose gelten können, wie z.B. die Stufenbildung, wurden bei Deutschen Schäferhund häufiger beobachtet als in der Kontrollgruppe. Zusätzlich konnten substantielle Schätzwerte für die Erbllichkeit dieser Veränderungen generiert werden. Eine Zuchtselektion erscheint damit sinnvoll.

3.1.3 Verlaufsuntersuchung der lumbalen Bandscheiben- und Facettengelenkveränderungen bei fünf Deutschen Schäferhunden

Studie 3

Paulus, Ch., Brinkmeier, H.S., Jährig, R.A., Schaub, K.I., Büttner, K., Kramer, M., **von Pückler, K.** (2022):

Verlaufsuntersuchung der lumbalen Bandscheiben- und Facettengelenkveränderungen bei 5 Deutschen Schäferhunden.

Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere; 50: 400–410.

Vorangegangene Studien haben beschrieben, dass degenerative Veränderungen des lumbosakralen Übergangs beim Deutschen Schäferhund mit bis zu 95% Häufigkeit auftreten (Seiler et al., 2008). In einigen Studien fiel zusätzlich eine besondere Geometrie der Facettengelenke beim Deutschen Schäferhund auf (Brenninger et al., 2006). Diese spezifische Geometrie der Facettengelenke wird von verschiedenen Autoren als Ursache einer höheren Bandscheibenbelastung beim Deutschen Schäferhund betrachtet (Seiler et al., 2002; Schaub et al., 2021). Zusätzlich wurde beschrieben, dass sich der Winkel der Facettengelenke mit zunehmendem Alter der Tiere vergrößert (Benninger et al., 2006).

Eine weitere Untersuchung beschreibt, dass die Bewegung des lumbosakralen Übergangs beim Deutschen Schäferhund im Vergleich zu anderen Hunden eingeschränkt ist. Dies weist darauf hin, dass die lumbosakrale Bandscheibe hierdurch höherem Stress ausgesetzt sein könnte (Schaub et al., 2021). Aus den bisherigen Beobachtungen ergibt sich die Frage nach einer Verlaufsuntersuchung der Degeneration der Bandscheibe bei einzelnen Individuen in Kombination mit einem Vergleich zur Facettengelenkmorphologie der kaudalen Lendenwirbelsäule. Ziel der vorliegenden Studie war es, Morphologie der Facettengelenke und Degenerationsgrad der Bandscheiben über eine Zeit von mehreren Jahren bei fünf Deutschen Schäferhunden zu eruieren.

Die Graduierung der Bandscheibenveränderungen in der vorliegenden Studie wurde in Anlehnung an vorangegangene Studien durch subjektive Einschätzung des Degenerationsgrades mithilfe eines „Visual grading scale“ (Seiler et al., 2003) sowie mit einer computerunterstützten Methode vorgenommen (Videman et al., 1994; Marinelli et al. 2009; Amort et al., 2012).

Zusätzlich kann die Signalintensität der Bandscheiben in der MRT semiquantitativ mithilfe einer „Region of interest“ (ROI) bestimmt werden. Diese semiquantitative Methode der Signalmessung bietet den Vorteil einer hohen Reproduzierbarkeit (Videman et al., 1994). In einer vorangegangenen Studie konnte festgestellt werden, dass bei fortschreitendem Degenerationsgrad der Bandscheiben bei Hunden eine signifikante Reduktion der Signalintensität in T2-gewichteten Sequenzen besteht (Amort et al., 2012). Die Lendenwirbelsäule der hier einbezogenen fünf Tiere wurden im Rahmen einer vorangegangenen Studie im Jahr 2015 in der CT und MRT mittels 16-Zeilen-Computertomografen und 1-Tesla-Magnetresonanztomografen untersucht (CT-Brilliance 16 Phi-

lips/MRT Intera Philips) (Schaub et al., 2021). Im Jahr 2021 wurden die Tiere für die vorliegende Studie im Rahmen einer Nachuntersuchung in einem Magnetresonanztomografen mit der Feldstärke 3 Tesla (Magnetom Prisma, Siemens Healthineers, Deutschland) untersucht. Die verwendeten Sequenzen in der MRT schlossen T2-gewichtete Sequenzen in sagittaler und transversaler Orientierung sowie jeweils eine dreidimensionale Sequenz mit ein. Bei den Tieren in dieser Studie handelte es sich um zwei weibliche und drei männliche unkastrierte Tiere, die in unterschiedlichem Maß sportlich eingesetzt wurden. Alle Hunde wurden im Alter von einem Jahr einer Beurteilung in Hinblick auf Hüftgelenkdysplasie (Ergebnis HD B oder besser), Ellenbogengelenkdysplasie (alle Hunde ED frei) und Konformation des lumbosakralen Übergangs (bei allen Hunden unauffällig) unterzogen.

Der Body Condition Score lag bei allen Hunden zwischen 3/9 und 5/9 mit einem Körpergewichtsmittelwert von 34,6 kg (mind. 26,7 kg/max. 45,0 kg). Das Alter der Hunde betrug 2015 für Hündin 1 21 Monate, Hündin 2 32 Monate, Rüde 1 27 Monate, Rüde 2 32 Monate und Rüde 3 19 Monate. In 2021 waren die Tiere bei Vorstellung relativ hierzu 92, 102, 97, 96 und 92 Monate alt.

Die akquirierten Bilddaten wurden in Hinblick auf die Facettengelenkwinkel, die Signalintensität und der Bandscheibenflächen (L5/6, L6/7 und L7/S1) mithilfe eines Apple iMac (Retina 5 K, 27 Zoll) unter Anwendung des Programms „Horos“ (Version 3.3.6, The Horos Project, 2020) analysiert. Jede Messung wurde 5-mal im Abstand von mindestens einer Woche wiederholt. Aus den Messungen wurde anschließend der Mittelwert errechnet. Die Winkelung der Facettengelenke wurde in der CT und in der 3D-MRT-Sequenz (Daten aus 2021) in Anlehnung an das Verfahren von Benninger et al. (2006) durchgeführt.

Die Messung der Signalintensität erfolgte in Anlehnung an die genannten vorangegangenen Studien (Seiler et al., 2003; Amort et al., 2012). Dabei wurden sowohl sagittal als auch transversal die Bandscheiben mittels „Closed Polygon Tool“ untersucht und die mittlere Signalintensität und die Fläche (in mm²) wurden festgehalten.

Eine Bestimmung des Nucleus-pulposus-Signals war in den Untersuchungen aus dem Jahr 2021 nicht möglich, da ein vollständiger Verlust des Signals bei allen Bandscheiben vorlag.

Zusätzlich zur Bestimmung der Signalintensität erfolgte die subjektive Graduierung nach Seiler et al. (2003) aus den Bilddaten beider Untersuchungszeitpunkte (2015 und 2021).

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Software SAS und in enger Kooperation mit der AG Biomathematik und Datenverarbeitung der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Ergebnisse mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant eingestuft.

Die erhobenen Kriterien Lokalisation (L5/6; L6/7; L7/S1), Schnittebene (dorsal, transversal, sagittal), Facettengelenkwinkel (°), Gradeinteilung nach Seiler (1; 2; 3; 4), Signalintensität (mean) sowie die maximale Bandscheibenfläche (mm²) flossen mit ein.

Mithilfe eines gepaarten t-Tests wurde daraufhin überprüft, ob sich die Mittelwerte jeweils für die untersuchten Parameter zwischen den Jahren (2015 und 2021) signifikant voneinander unterscheiden. Die Normalverteilung der Daten wurde mittels Shapiro-Wilk-Test geprüft. Zusätzlich wurden Korrelationen nach Spearman zum Vergleich der Daten eingesetzt.

Unter Einsatz des Graduierungsschemata von Seiler et al. (2003) zeigte sich eine deutliche Zunahme des Degenerationsgrades der lumbosakralen Bandscheibe von 2,2 (2015) auf 3,6 (2021).

Die kranial gelegenen Bandscheiben wiesen eine geringere Zunahme auf. In der Messung der Signalintensitäten mittels ROI zeigte sich ein genereller Rückgang des Signals außer bei R5/6. Dieser wies einen Signalanstieg in allen drei Lokalisationen auf.

Die Untersuchung der Facettengelenkwinkel zeigte bei L5–6 keinen Zusammenhang mit der Graduierung nach Seiler et al. (2003). Bei der Korrelation der Winkel mit der gemessenen Signalintensität war in der Untersuchung von 2015 ein weiter Winkel mit einer niedrigen Signalintensität korreliert, während 2021 ein weiter Facettengelenkwinkel mit einer höheren Signalintensität einherging. Der Facettengelenkwinkel nahm innerhalb eines Untersuchungszeitpunkts in der transversalen Untersuchung von kaudal nach kranial ab.

In der Untersuchung von 2015 zeigte sich ein kleiner Winkel im Dorsalschnitt mit einer niedrigeren Graduierung assoziiert. Ein größerer Winkel ging in der Folgeuntersuchung mit einer höheren Signalintensität einher. Dies zeigte sich auch in den Transversalschnitten für beide Zeitpunkte.

Bei den Facettengelenken von L5–S1 war mit zunehmendem Alter der Hunde eine geringe Erweiterung des Winkels feststellbar.

Die Bandscheibenfläche nahm zu beiden Untersuchungszeitpunkten von kranial nach kaudal ab. Der deutlichste Unterschied der Bandscheibenflächen im Verlauf war bei L7–S1 feststellbar.

Die Bandscheiben wiesen an allen drei Lokalisationen in sagittaler und transversaler Ebene eine teils signifikante Signalreduktion mit bis zu 82% auf.

Im Dorsalschnitt war ein signifikanter Zusammenhang zwischen einem weiten Winkel und einer niedrigen Signalintensität in 2015 gegeben ($p = 0,03$). Die Ergebnisse zur Winkeldifferenz und zur Korrelation mit der Signalintensität stellten sich als sehr heterogen und für jedes Bandscheibenfach und zu jedem Zeitpunkt unterschiedlich dar.

Die Ergebnisse zur Betrachtung der Bandscheibenfläche erwiesen sich für mehrere Lokalisationen als signifikant. Vier der fünf Probanden zeigten im Jahr 2021 eine gering- bis mittelgradige Vorwölbung der Bandscheibe mit Kontakt zu den Cauda-equina-Fasern. Bei zwei Hunden bestand eine geringgradige Kompression der Cauda-equina-Fasern. Bei allen Probanden konnten in der Untersuchung von 2021 juxtaartikuläre Facettengelenkzysten nachgewiesen werden.

Wie in einer vorangegangenen Untersuchung (Amort et al., 2012) kann die Signalintensitätsmessung zur Unterstützung der Einordnung des Grades nach Seiler (2003) herangezogen werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen vermuten, dass die Messung der Signalintensität im Transversalschnitt verlässlicher gelingt.

Hinsichtlich der Facettengelenkmorphologie benennen Seiler und Mitarbeiter eine große Winkeldifferenz als ursächlich für eine frühe Degeneration, während Rossi und Mitarbeiter (Rossi et al. 2004) einen kleinen Facettengelenkwinkel mit einem hohen Degenerationsgrad korrelieren. In der vorliegenden Studie zeigte sich ein heterogenes Bild und ein eindeutiger Zusammenhang der Winkelgröße mit dem Degenerationsgrad der Bandscheibe bestand nicht. Wie in der Studie von Benninger (2006) konnte auch hier eine heterogene Facettengelenkmorphologie mit Asymmetrien beobachtet werden. Eine Varianz des Winkels von kranial nach kaudal bestand wie in vorangegangenen Studien auch in der vorliegenden Untersuchung (Steffen et al., 2004; Brenninger et al., 2006). In der Studie von Brenninger et al. (2004) konnte eine deutlichere altersabhängige Zunahme der Winkelweite festgestellt werden.

Genau wie in der Studie von Seiler et al. (2003) konnte in der vorliegenden Studie festgestellt werden, dass der Winkelunterschied zwischen L7–S1 und L6–7 transversal groß ist. Sie stützt damit die These von Seiler et al. (2003), dass dieser Befund ein Faktor bei der früh degenerativen Veränderung der Bandscheibe sein kann. Erwartungsgemäß zeigte sich mit zunehmendem Alter eine Zunahme der Bandscheibenfläche. Dies kann ggf. auf Protrusionen der Bandscheiben hinweisen. Eine Limitation der hier vorgestellten Studie ist die geringe Probandenzahl. Zusätzlich wurden die untersuchten Hunde besonders sportlich eingesetzt, was einen weiteren Einfluss auf die Degeneration der Bandscheibe gehabt haben kann.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die vorliegende Studie die Beobachtungen aus der Literatur bestätigen konnte und dass Deutsche Schäferhunde auch in der vorliegenden Studie eine Prädisposition für eine zunehmende Bandscheibendegeneration und Veränderung der Facetengelenkwinkel aufwiesen (Denny et al., 1982; Jaggy et al., 1987; Seiler et al., 2002; Amort et al., 2012).

Die vorliegende Studie lässt vermuten, dass die frühe Untersuchung der Bandscheiben mittels MRT keinen Mehrwert hat, da die Befunde in der initialen Untersuchung keine eindeutige Korrelation mit einer späteren Bandscheibendegeneration und der Ausprägung der Degeneration bzw. Protrusion aufweisen. Bei jüngeren Hunden kann eine MRT-Untersuchung daher nur dann als besonders sinnvoll erachtet werden, wenn klinische Befunde vorliegen.

3.1.4 Muskulotendinopathie des M. gastrocnemius bei verschiedenen Hunderassen

Studie 4

Kaiser, S.M., Harms, O., Konar, M., Staudacher, A., Langer, A., Thiel, C., Kramer, M., Schaub, S., **von Pückler, K.H.** (2016):

Clinical, radiographic, and magnetic resonance imaging findings of gastrocnemius musculotendinopathy in various dog breeds.

Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology; 29: 515–552.

Die Muskulotendinopathie des M. gastrocnemius ist eine Erkrankung, die in vorangegangenen Studien vor allem bei Hütehunden beschrieben wurde (Stahl et al., 2010). In frühen Stadien der Erkrankung stellt die Magnetresonanztomografie das Mittel der Wahl dar, um akute Prozesse zu detektieren (Stevens et al., 1999). In der MRT können aktive Prozesse anhand ihres hyperintensiven Signals in flüssigkeitssensitiven Sequenzen, besonders in solchen mit Fettunterdrückung, von ausgeheilten inaktiven Prozessen unterschieden werden (Stahl et al., 2010).

Betroffene Hunde zeigen neben einer Hinterhandlahmheit oft eine Schmerzhaftigkeit bei Druck auf die Fabellae. Meist bestehen keine weiteren Veränderungen am Kniegelenk. Obwohl häufiger aktive Hunde betroffen sind, sind Traumata in der Regel vorberichtlich nicht bekannt. Als Therapie kommt in den meisten Fällen eine multimodale Schmerztherapie inklusive Physiotherapie mit guter Prognose infrage (Stahl et al., 2010, Fiedler et al., 2013).

Die vorliegende retrospektive Studie beschreibt die klinischen, röntgenologischen und magnetresonanztomografischen Befunde in einer Gruppe von 16 Hunden aus unterschiedlichen Rassen mit Verdacht auf eine Muskulotendinopathie des M. gastrocnemius. Keiner der hier vorgestellten Hunde wurde sportlich geführt oder als Hütehund eingesetzt.

Ziele der Studie waren die Erweiterung des bisher bestehenden Wissens hinsichtlich der Tendinopathie des M. gastrocnemius und die Untersuchung der Erkrankung in der Population heterogener Hunderassen.

Im Rahmen der Studie wurden die Daten von 16 Hunden ausgewertet, die in der Zeit von 2009 bis 2014 in der Klinik für Kleintiere der Justus-Liebig-Universität in Gießen oder in der Tierklinik Lüneburg vorgestellt wurden und die Diagnose „Muskulotendinopathie des M. gastrocnemius“ erhalten hatten. Zusätzlich zur Auswertung der vorhandenen Patienten- und Bilddaten wurde eine telefonische Befragung zum Verlauf der Erkrankung bei den Hunden durchgeführt. Röntgenbilder und magnetresonanztomografische Untersuchungen wurden von einem Diplomate des ECVDI (KP) und einem Resident des ECVS (SK) in Konsens ausgewertet. Anhand der Röntgenbilder wurde festgehalten, ob Veränderungen an den Fabellae oder am Gelenk vorlagen. Zusätzliche Befunde (z.B. eine Gelenkfüllung) wurden festgehalten. Die Befunde wurden subjektiv in ein Graduierungs-

system mit den Stufen 0–4 überführt (keine Veränderungen, gering-, mittel-, und hochgradige Veränderungen).

Die MRT-Untersuchungen erfolgten mittels einem 1-Tesla-System (3 Patienten) und einem 0,2-Tesla-System (13 Patienten). Die Untersuchungsparameter wurden an die Patientengröße angepasst, um jeweils eine optimale Bildqualität zu erreichen. Dies resultierte in einer variablen Schichtdicke von bis zu 4 mm.

Verfügbare Sequenzen schlossen dorsale und sagittale Schichten sowie transversale Schichten (15 Fälle) mit ein. Es lagen T2-gewichtete, fettunterdrückte, Protonendichte gewichtete und T1-gewichteten Sequenzen (vor und nach Kontrastmittelapplikation) vor.

Bei der subjektiven Begutachtung wurden Intensitätsabweichungen in die Kategorien „hyperintens“, „hypointens“ oder „gemischt“ eingeteilt. Das Ausmaß des veränderten Signals und die Kontrastmittelanreicherung wurden ebenfalls in Stufen von 0–4 festgehalten (abwesend, geringgradig, mittelgradig, hochgradig). Weitere Veränderungen der Kniegelenkregion flossen in die Dokumentation ein.

Die Statistik enthielt einen deskriptiven Anteil der Basisdaten sowie eine Untersuchung der Korrelationen in Hinblick auf die Variablen in den bildgebenden Verfahren mittels einer spezifischen Software (SPSS Software: IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Germany). Hierfür wurde ein Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman bestimmt. P-Werte $< 0,05$ wurden als signifikant betrachtet.

In die Untersuchung wurden Hunde unterschiedlicher Rassen eingebunden (6 Australian Shepherds, 2 Berner Sennenhunde und jeweils 1 Labrador Retriever, Golden Retriever, Entlebucher Sennenhund, Cão da Serra de Aires, Airedale Terrier, Irish Soft Coated Weathen Terrier und ein Mischling). Sechs Hunde waren männlich, 10 Hunde weiblich. Das Alter der Hunde betrug zwischen 4 und 12 Jahren (mittleres Alter 7 Jahre). Das Körpergewicht lag bei 28,4 kg (15–46,7 kg). Ein Hund hatte zuvor eine Kniegelenkoperation erhalten. Eine Lahmheit wurde mit variablen Zeitspannen beobachtet (1 Woche bis zu mehr als 4 Wochen). Die linke Hintergliedmaße war bei 9 Hunden, die rechte Hintergliedmaße bei 7 Hunden klinisch auffällig. Während 13 Hunde zum Zeitpunkt der Vorstellung lahm waren, zeigten ebenfalls 13 Patienten Schmerzen bei der Palpation und 7 Hunde wiesen eine Kniegelenkfüllung auf. Tibiakompressionstest und Schubladentest waren bei 12 Patienten negativ. Eine Vorbehandlung durch eine überweisende Praxis bestand bei 13 Patienten. Bei 7 Patienten wurden nichtsteroidale Antiphlogistika eingesetzt.

Für 14 Hunde lagen Röntgenbilder in mediolateralem und kraniokaudalem Strahlengang vor. Bei einem Hund war lediglich eine mediolaterale Aufnahme verfügbar. Bei einem Patienten wurden keine Röntgenbilder angefertigt. Die Röntgenbilder von 8 Hunden zeigten keine Veränderungen an der lateralen Fabella. Die übrigen Aufnahmen zeigten unterschiedliche Ausprägungen von Knochenneubildungen (4 geringgradig, 2 mittelgradig, 1 hochgradig). Ein Hund wies zusätzlich geringgradige Veränderungen an der medialen Fabella auf. Elf Hunde zeigten keine arthrotischen Veränderungen am Kniegelenk. Zwei der Hunde zeigten geringe Anzeichen einer Gelenkfüllung, eine mittelgradige Anzeichen. Patellaveränderungen bestanden bei 3 Patienten.

An 12 der untersuchten Hintergliedmaßen konnte in nativen Sequenzen eine T1-gewichtete und T2-gewichtete Hyperintensität des lateralen Gastrocnemiusursprungs festgestellt werden. Die üb-

rigen Hintergliedmaßen wiesen ein hypointenses T1-gewichtetes Signal (3 Hunde) oder gemischtes T1-gewichtetes Signal (1 Hund) auf. Das Signal war von gering- bis mittelgradiger Ausprägung. In T2-Wichtung zeigte sich bei einem Patienten ein hypointenses Signal, bei einem weiteren ein heterogenes Signal.

In T1-gewichteten Sequenzen ergaben sich zusätzlich folgende Befunde: Im medialen Anteil des Gastrocnemiusursprungs waren bei 14 Hunden keine Signalerhöhung feststellbar. Zwei Hunde zeigten ein hyperintenses Signal mit gering- bis mittelgradigem Ausmaß. Nach intravenöser Kontrastmittelapplikation (10 Patienten) konnte in allen Fällen eine geringgradige Kontrastmittelanreicherung der betroffenen Region im lateralen Gastrocnemiusursprung festgestellt werden. Bei einem Hund wurde im medialen Gastrocnemiusursprung eine geringgradige Kontrastmittelanreicherung nachgewiesen.

In T2-gewichteten Sequenzen ergaben sich zusätzlich folgende Befunde: Sieben Hunde zeigten ein hyperintenses Signal im medialen Anteil des M. gastrocnemius. Bei einem Hund wurde ein hypointenses Signal nachgewiesen.

Alle Patienten wurden mithilfe von fettunterdrückten STIR-Sequenzen untersucht. Im lateralen Muskelbauch fand sich ein hyperintenses Signal mit mittelgradiger Ausprägung, während im medialen Anteil 5 Hunde eine hyperintense Region und 1 Hund eine hypointense Region zeigten.

Die Protonendichtegewichtete Untersuchung kam lediglich bei 4 Patienten zum Einsatz. Hier zeigte sich ein hyperintenses Signal mit gering- bis mittelgradiger Ausprägung im lateralen Anteil und ein Fall mit hypointensem Signal im medialen Anteil des M. gastrocnemius.

Veränderungen des Muskelvolumens wurden nicht beobachtet. Es bestand eine Teilruptur des kranialen Kreuzbandes bei 2 Patienten. Meniskusveränderungen wurden bei 2 Hunden detektiert. Die Hunde wurden mit unterschiedlichen therapeutischen Protokollen konservativ behandelt. Die Therapie schloss neben Ruhighaltung und Schmerzmitteln bzw. Entzündungshemmern bei 9 Hunden professionelle Physiotherapie mit ein. Ein Hund wurde aufgrund einer Ruptur des kranialen Kreuzbandes mittels Tibia Tuberosity Advancement (TTA) operiert. Dieser Hund zeigte im Anschluss einen deutlichen Rückgang der Lahmheit.

Die telefonischen Befragungen ergaben, dass 11 Hunde nach konservativer Behandlung wieder zur ursprünglichen Leistung zurückkehren konnten. Dies schloss auch den sportlichen Einsatz ein. Ein Hund zeigte keine Verbesserung des Status trotz Therapie. Ein weiterer Hund, der zuvor eine Operation mit „Modified Paquet Procedure“ erhalten hatte, zeigte eine intermittierende Lahmheit. Entgegen der bisherigen Annahme konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass nicht ausschließlich Hütehunde von der Erkrankung betroffen sind. Dennoch waren auch in der hier vorgestellten Population Hütehunde inkludiert. Die Erkrankung ist ebenfalls in der Humanmedizin bekannt und wird auf abrupte Bewegungen, besonders im Sport, zurückgeführt (Jacobson et al., 2005; Koulouris et al., 2007). Im Gegensatz hierzu wurden die meisten der in der vorliegenden Studie untersuchten Hunde als Familientiere gehalten. Auch ein initiales Trauma wurde bei den meisten Patienten nicht beobachtet. Die klinischen Befunde deckten sich mit den vorangegangenen Berichten und Hauptsymptome waren neben einer Lahmheit auch ein Palpationsschmerz auf Höhe der Fabellae. Zusätzlich wurde in unserer Studie bei 7 Patienten ein Gelenkerguss festgestellt. Auch die Erkrankungsdauer war in der vorliegenden Studie divers mit akuten und chroni-

schen Verläufen. Wie in vorangegangenen Berichten beschrieben, zeigten sich Knochenneuformationen an der betroffenen (meist lateralen) Fabella und am Ursprung des M. gastrocnemius. Die Veränderungen sind auf wiederholte Mikrotraumata und Mikrofaserrisse zurückzuführen und zeigen den chronisch degenerativen Charakter der Erkrankung (Dawid et al., 1992; Robinson et al., 1999). Zusätzlich können dystrophe Mineralisationen vorliegen (Dawid et al., 1992). In der vorliegenden Untersuchung wurden in der MRT unterschiedliche Stadien einer chronisch aktiven Entzündungsreaktion festgestellt. Die ödematöse Komponente zeigte sich besonders in der Hyperintensität in STIR- und T2-gewichteten Sequenzen. Die aktiv entzündliche Komponente wird durch die Kontrastmittelanreicherung repräsentiert. Ähnlich wie in der Studie von Stahl et al. (2010) konnten zusätzlich hyperintense Veränderungen in nativen T1-gewichteten Sequenzen festgestellt werden. Zusätzlich zeigten sich auch hypointense oder gemischte Areale veränderter Signalintensität. Fiedler et al. (2013) beschrieben ebenfalls ein hypointenses Signal im Ursprung des lateralen M. gastrocnemius. Die Variation der Signalintensität ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Dauer der Erkrankung bzw. das Erkrankungsstadium zurückzuführen. T1- hypointense Veränderungen sind auf ödematöse Veränderungen oder auf fibrotische Areale oder Mineralisationen zurückzuführen (Fiedler et al., 2013). Hyperintensitäten in T1-gewichteten Sequenzen sprechen dagegen für eine Infiltration mit Fettgewebe und repräsentieren den Ersatz des atrophierten Gewebes bei einer chronischen Muskelatrophie (Fiedler et al. 2013). Weitere Gründe für T1-gewichtete Hyperintensitäten in der MRT können zellreiche, proteinreiche Infiltrate oder Blutungen darstellen, die in der vorliegenden Studie durch die Kombination mit den anderen Sequenzen als Ursache ausgeschlossen werden konnten (Zyed et al. 1991). Zusammenfassend waren die klinischen Befunde mit den MRT-Befunden in der vorliegenden Studie kongruent.

Die Korrelationsanalyse zeigte einen signifikanten Zusammenhang von Gelenkeffusion und Veränderungen an der lateralen Fabella. Die Gelenkfüllung könnte damit als Hinweis auf einen schwereren Krankheitsverlauf dienen.

In der vorliegenden Studie konnten 84,6% der Patienten mithilfe einer konservativen Therapie wieder zu ihrer ursprünglichen Funktion zurückkehren (11 von 13 Hunden). Bei keinem der Hunde wurde im Untersuchungszeitraum ein Rezidiv beobachtet. Dies deckt sich mit vorangegangenen Berichten (Stahl et al., 2010; Fiedler et al., 2013). Auch in der Humanmedizin werden geringe Rezidivraten nach konservativem Management beobachtet (Millar, 1979).

Die Limitation der vorliegenden Untersuchung war besonders die geringe Patientenzahl in Kombination mit heterogenen Untersuchungsmustern und Vorberichten.

Dennoch konnte die vorliegende Studie das Auftreten der Muskulotendionopathie des M. gastrocnemius und ihr spezifisches röntgenlogisches und magnetresonanztomografisches Erscheinungsbild bei unterschiedlichsten Hunderassen beschreiben. Es hat sich gezeigt, dass auch der mediale Anteil des M. gastrocnemius beteiligt sein kann und dass die MRT Aufschluss über unterschiedliche Erkrankungsstadien bzw. den Heilungsverlauf bringen kann. Die Muskulotendinopathie sollte als Differenzialdiagnose bei Hinterhandlahmheiten, unabhängig von der Hunderasse, dem Alter und dem Geschlecht als Differenzialdiagnose in Betracht gezogen werden. Ein konservatives Management ist in vielen Fällen ausreichend, um eine Heilung zu erreichen.

3.1.5 Muskulotendinopathie des M. gastrocnemius bei einem Labrador Retriever

Studie 5

Fiedler, A.M., **Amort, K.H.**, Bokemeyer, J., Kramer, M. (2013):
Musculotendinopathy of the gastrocnemius muscle in a Labrador Retriever. A case report.
Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere; 41: 349–354.

Der hier vorgestellte Fall beschreibt eine Muskulotendinopathie des M. gastrocnemius bei einem Labrador Retriever und gibt den individuellen Heilungsverlauf wieder.

Bei der vorgestellten Patientin handelte es sich um eine 9 Jahre alte (kastrierte) Labrador Retriever Hündin, die mit einem Körpergewicht von 23 kg eine reguläre Körperkonformation aufwies. Vorberichtlich zeigte die Hündin seit 3 Monaten eine wiederkehrende Lahmheit der linken Hintergliedmaße. Die Hündin wurde als Rettungshund trainiert und eingesetzt. Vorangegangene Therapieversuche mit Physiotherapie und Schmerzmittelgabe brachten keine Besserung der Symptome.

Die allgemeine klinische Untersuchung war ohne besondere Befunde. In der klinisch-orthopädischen Untersuchung konnte eine geringgradige Lahmheit (Grad 1 von 4) der linken Hintergliedmaße im Schritt mit einer verkürzten Vorführphase festgestellt werden. Bei der Untersuchung des linken Kniegelenks zeigte die Patientin eine Schmerzhaftigkeit, besonders bei Druck auf die Fabelae und bei maximaler Streckung. Bei maximaler Rotation des rechten Hüftgelenks kam es ebenfalls zu einer Schmerzreaktion.

In der Röntgenuntersuchung des linken Kniegelenks konnten periartikuläre Mineralisationen kaudal am distalen Femur, besonders am Ursprung des lateralen M. gastrocnemius festgestellt werden. Am rechten Kniegelenk waren vergleichbare Befunde feststellbar. An der lateralen Fabella zeigten sich glatt begrenzte mineraldichte Knochenneubildungen und am Ursprung des lateralen M. gastrocnemius Knochenneubildungen, die dem Verlauf des Muskels folgten im Sinne von Enthesophyten. Zusammenfassend bestanden Hinweise auf eine bilaterale chronische Muskulotendinopathie des lateralen M. gastrocnemius beidseitig sowie nebenbefundlich eine geringgradige Coxarthrose.

Die Veränderungen am Kniegelenk wurden mit einem Magnetresonanztomografen (Philips Gyroscan Intern 1.0 Tesla) untersucht. In die Untersuchungen waren T2-gewichtete, sagittale und transversale Sequenzen, STIR (Short Tau Inversion Recovery; fettunterdrückte) Sequenzen in sagittaler und dorsaler Orientierung, Protonendichte-gerichtete dorsale Sequenzen sowie T1-gewichtete Sequenzen in sagittaler und transversaler Orientierung vor und nach intravenöser Kontrastmittelapplikation (Gadolinium-DTPA Dotarem® 0,01 mmol; Guerbet) eingeschlossen. In T2-gewichteten und fettunterdrückten Sequenzen zeigte sich am Ursprung des lateralen M. gastrocnemius ein unscharf begrenztes hyperintenses Areal, das dem Verlauf der Muskulatur mehrere Zentimeter nach distal folgte. In T1-gewichteten Sequenzen zeigte sich das Areal nativ hypointens

und unregelmäßig begrenzt. Nach intravenöser Kontrastmittelapplikation war im proximalen Anteil des lateralen M. gastrocnemius eine heterogene mittelgradige Mehranreicherung feststellbar. Zusammenfassend sprachen die Befunde für eine ödematös-entzündliche Veränderung. Als Differenzialdiagnose konnten perakute oder chronische Einblutungen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Es bestand eine Muskulotendinopathie Grad 1–2 des lateralen M. gastrocnemius. Daraufhin erfolgte eine weitere konservative multimodale Schmerztherapie mit Leinenzwang und teilweiser Schonung für 6 Wochen sowie anschließender langsamer Belastungssteigerung und Physiotherapie. Die Hündin wurde 8,5 Monate nach Therapiebeginn wieder vorgestellt. Eine Lahmheit war vorberichtlich seit der Beendigung der Schonungsphase nicht mehr vorhanden. Die spezielle klinisch-orthopädische Untersuchung zeigte keine Lahmheit und lediglich eine geringe Unwilligkeit bei intensivem Druck auf die laterale Fabella. In der Röntgenkontrolle war eine Glättung der periartikulären Mineralisationen sichtbar. In der nativen MRT-Untersuchung konnte in allen Sequenzen in der ehemals T2-hyperintensiven Region ein hypointenses Areal festgestellt werden. Nach intravenöser Kontrastmittelapplikation war keine Mehranreicherung bzw. Hyperintensität sichtbar. Die Befunde sprachen für eine Fibrose des betroffenen Areals und damit für eine abgeheilte Muskulotendinopathie. Im vorgestellten Fall handelte es sich um eine chronische und partielle Läsion des Muskel-Sehnen-Übergangs (Dawid et al., 1992; Stahl et al., 2010). Da die vorliegende Fallbeschreibung zeigt, dass nicht nur Hütehunde von der Muskulotendinopathie betroffen sind, liegt ein Einfluss des sportlichen Einsatzes der Tiere nahe. Alle klinischen Befunde waren im vorliegenden Fall als typisch für eine Muskulotendinopathie des M. gastrocnemius anzusehen. Im Rahmen des vorgestellten Falles konnte gezeigt werden, dass die Muskulotendinopathie des M. gastrocnemius nicht nur bei Hütehunden auftritt und bei Rassen, wie z.B. dem Labrador Retriever, ebenfalls einen typischen Verlauf nimmt. Dies unterstützt die These, dass neben dem Verdacht auf eine Rasseprädisposition vor allem ein besonderes Augenmerk auf diese Differenzialdiagnose gelegt werden sollte (Ridge et al., 2005; Mueller et al., 2009; Stahl et al., 2010).

3.1.6 Die Rolle der Femurkopfgröße und -überdachung bei Hunden mit und ohne Hüftgelenkdysplasie

Studie 6

Pilli, M., Seyrek Intas, D., Etikan, I., Yigitgor, P., Kramer, M., Tellhelm, B., **von Pückler, K.** (2023): The Role of Femoral Head Size and Femoral Head Coverage in Dogs with and without Hip Dysplasia. *Veterinary Science*; 10: 120.

Die Hüftgelenkdysplasie des Hundes ist eine der häufigsten Ursachen für Lahmheit der Hintergliedmaßen beim Hund. Es besteht ein deutlicher genetischer Hintergrund der Erkrankung (Binversie et al., 2022). Zur Zuchtselektion werden Röntgenuntersuchungen eingesetzt. Für das Screening mit Hilfe des Systems der Fédération Cynologique Internationale (FCI) sind Röntgenaufnahmen des Beckens von ausgewachsenen Hunden vorgesehen. Die Aufnahmen werden mit gestreckten Hintergliedmaßen in tiefer Sedation der Hunde angefertigt (Flückiger, 2007; Kyriazis und Prassinis, 2016).

Besondere Kriterien bei der Beurteilung der Röntgenaufnahmen sind z.B. Hinweise auf eine primäre Gelenklockerheit, der sog. Norberg-Winkel und die prozentuale Überdachung des Femurkopfes durch das Acetabulum. Zusätzlich werden sekundäre arthrotische Veränderungen und Umbauprozesse beachtet (Tomlinson und Cook, 2002; Flückiger, 2007; Janssens et al., 2014; Kyriazis und Prassinis, 2016; Tellhelm et al., 2022).

Die Kongruenz des Hüftgelenks ist ein weiterer wichtiger Faktor bei der Einteilung der Gelenke in unterschiedliche Dysplasiestufen (Wigger et al., 2008). Die Rolle der Form des Femurkopfes wurde ebenfalls in Hinblick auf die Hüftgelenkdysplasie eruiert. Die Größe des Femurkopfes hat jedoch bisher nur wenig Beachtung gefunden (Willemsen et al., 2002).

Das Ziel der Studie war die Untersuchung des sog. Femurkopf-Areals (femoral head area, FHA), der prozentualen Überdachung des Femurkopfes (coverage of the femoral head, CFH) und der kraniokaudalen Ausdehnung des Acetabulum. Zusätzlich wurde der Einfluss des Geschlechts und der Rasse auf die Parameter untersucht. Hunde mit und ohne Dysplasie sollten verglichen werden. Dabei wurden die Grade A und B und C bis E in zwei Gruppen zusammengefasst.

Die Studie schloss Deutschdrahthaar Hunde (DDH), Deutsche Schäferhunde (DSH) und Labrador Retriever (LR) ein. Alle Hunde waren zwischen 1 und 4 Jahren alt. Für die digitalen Röntgenbilder wurden die Hunde in ventrodorsaler Position mit gestreckten und symmetrischen Hintergliedmaßen geröntgt. Die Hüftgelenke wurden im Anschluss anhand des FCI-Schemas von zwei Auswertenden geblindet beurteilt (Flückiger, 2007).

Die Fläche des Femurkopfes (FHA) und die Überdachung durch das Acetabulum (CFH) wurden mithilfe einer DICOM Software (Version V3.3.6, Horos, for Apple Macintosh) durch einen weiteren

Auswertenden dokumentiert. Durchmesser, Umfang und Fläche (in cm²) des Femurkopfes wurden mit einer „Region of Interest“ (ROI) bestimmt. Zusätzlich wurde die Überschneidung des Femurkopfes mit dem Acetabulum festgehalten. Die prozentuale Überdachung des Femurkopfes (Tomlinson et al., 2002; Janssens et al., 2015) sowie die kürzeste Distanz zwischen dem kraniallateralen und kaudolateralen Rand des Acetabulum wurden berechnet. Die Auswertungen wurden mit den Ergebnissen des FCI-Schemas korreliert. Dabei wurden die Ergebnisse von Hunden mit und ohne Hüftgelenkdysplasie verglichen. Die Daten wurden mittels IBM SPSS Statistics 23.0 analysiert. Werte mit $p < 0,05$ wurden als signifikant eingeordnet.

Die Studie schloss 264 Hunde ein. Die Häufigkeit dysplastischer Gelenke betrug 11,6% bei DDH, 35,8% bei DSH und 44,3% in der LR-Gruppe.

Bei der genaueren Betrachtung des FHA war erkennbar, dass ein Zusammenhang mit der Rasse, dem Geschlecht und dem FCI-Grad bestand ($p = 0,011$).

In Hinblick auf die FCI-Grade war auffällig, dass in der Gruppe der DDH keine Hunde mit Grad E und keine weiblichen DDH mit Grad D vorkamen.

Bei männlichen DSH zeigte sich ein kleineres FHA bei Hunden mit FCI-Grad A bis D. Dennoch zeigten die weiteren Ergebnisse, dass das FHA nicht als Kriterium zur Einstufung in Grad E eingesetzt werden kann.

Im Vergleich der Rassen in Hinblick auf die FHA-Messung war feststellbar, dass DDH einen signifikant größeren Messwert für FHA aufwies und bei männlichen Hunden mit FCI-Grad A signifikante Rasseunterschiede bestanden. Eine ähnliche Beobachtung konnte für FCI-Grad B bei männlichen Tieren gemacht werden. Bei männlichen Hunden mit Grad C konnten keine Rasseunterschiede festgestellt werden, während bei Grad D Unterschiede zwischen DDH und den anderen Rassen bestanden. Die Werte waren bei DSH größer als bei LR, wenn Hunde mit Grad E verglichen wurden. Auch bei weiblichen Hunden war der Messwert für FHA bei DDH größer als bei den beiden anderen Rassen. DDR unterschieden sich signifikant von den anderen Rassen bei Hunden mit FCI-Grad A und B und bei Hunden mit FCI-Grad C gab es einen signifikanten Unterschied zwischen DDH und LR.

Bei DSH zeigte sich ein signifikant größerer FHA bei den Graden A und E.

In Hinblick auf die Überdachung des Femurkopfes durch das Acetabulum (CFH) konnten signifikante Zusammenhänge zwischen der Rasse, dem Geschlecht und dem FCI-Grad festgestellt werden ($p < 0,001$).

Bei allen Rassen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen dysplastischen und nichtdysplastischen Gelenken in Hinblick auf die Konformation festgestellt werden.

Auch bei der Betrachtung zwischen den Rassen bestanden signifikante Unterschiede – z.B. in Hinblick auf den CFH-Wert.

Bei der Messung der kraniokaudalen Ausdehnung des Acetabulum (CrCdAR) konnte ein Einfluss von Rasse, Geschlecht und FCI-Grad festgestellt werden ($p = 0,003$).

Bei DDR und LR konnte eine schwache negative Korrelation zwischen dem FCI-Grad und dem FHA festgestellt werden. Bei kleinerem CFH zeigte sich ein schlechterer FCI-Grad – diese negative Korrelation war bei DDR und DSH mittelgradig und bei LR bei beiden Geschlechtern hoch. Es bestand keine Verbindung zwischen dem FCI-Grad und dem CrCdAR-Messwert. Auch zwischen FHA und CFH bestand keine Korrelation. Eine deutliche positive Korrelation befand zwischen FHA und CrCdAR.

In der vorliegenden Studie zeigten DDH, die in der Regel eine geringe Prävalenz für Hüftgelenkdysplasie aufweisen, einen signifikant größeren FHA bei Hunden mit FCI-Grad A und B im Vergleich zu den anderen Rassen. Generell zeigte sich mit wenigen Ausnahmen ein geringerer FHA-Messwert bei Hunden mit deutlicherer Dysplasie. Die Messung des FHA zeigte sich in Hinblick auf die Graduierung der Dysplasie jedoch nicht hilfreich.

Bei normalen und fast normalen Hüftgelenken konnte bei DDH größere FHA festgestellt werden. Geschlechterunterschiede konnten bei DDH und GSD bei normalen Gelenken festgestellt werden. Einige Studien beschreiben ein häufigeres Auftreten der Hüftgelenkdysplasie bei weiblichen Tieren (Loder und Todhunter, 2017).

Auch in der vorgestellten Studie trat die Hüftgelenkdysplasie bei weiblichen DSH beinahe 2-fach häufiger auf als bei männlichen. Andere Studien beschreiben, dass beim Hund keine Geschlechterprädisposition besteht (Pascual-Garrido et al., 2018; Willemsen et al., 2021).

Für die Überdachung des Femurkopfes durch das Acetabulum wurden von Tomlinson und Johnson (2002) genauere Werte als cut off für bestimmte Rassen vorgeschlagen, wie z.B. 42,2% bei LR und 44,8% bei DSH. Weitere Werte wurden von Mostafa et al. (2022) mit < 53% für LR vorgeschlagen. In der hier vorgestellten Studie zeigte sich ein cut off zwischen HD A und HD B bei 45% Überdachung.

Bei DDH mit FCI-Grad A und B bestanden keine Unterschiede der CFH-Messwerte bei den Geschlechtern. Es bestanden jedoch deutliche Unterschiede zu den anderen FCI-Graden. Hier scheint eine Unterscheidung zwischen dysplastischen und nichtdysplastischen Gelenken möglich. Bei LR war im Unterschied zu DSH eine deutliche Unterscheidung zwischen den FCI-Graden möglich. Bei LR kann der CFH-Messwert bei der FCI-Graduierung hilfreich sein.

Der CrCdAR zeigte sich in Hinblick auf die FCI-Graduierung als wenig hilfreich. Der größere Wert bei männlichen Tieren entspricht den Erkenntnissen aus vorangegangenen Studien, die den sexuellen Dimorphismus des Beckens beim Hund beschreiben (Fealey et al., 2017) und zeigen, dass Rüden ein größeres Becken als Hündinnen haben.

Der hier genannte CFH-Messwert wurde in einer vorangegangenen Studie (Franco-Goncalo et al., 2022) in Kombination mit der Größe des Acetabulum dazu genutzt, einen Algorithmus zur Berechnung der HD zu etablieren. Der berechnete Index aus den beiden Messwerten war mit dem FCI-Grad korreliert.

Die Ergebnisse der hier vorgestellten Studie zeigen, dass keiner der Messwerte dazu geeignet war, eine Inkongruenz des Hüftgelenks im Sinne einer Dysplasie zu quantifizieren.

FHA- und CFH-Messwert zeigten sich rassespezifisch und größer bei männlichen Hunden (DDH und DSH). FHA und CrCdAR zeigten eine deutliche Korrelation – dies spricht für eine proportionale Entwicklung der einzelnen knöchernen Anteile. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen lediglich Tendenzen zu den Werten von FHA und CFH auf und sollten an einer größeren Studienpopulation validiert werden.

Zusammenfassend konnte die Studie zeigen, dass multiple Besonderheiten in Hinblick auf die knöcherne Konformation des Beckens bestehen, die sowohl durch die Rasse als auch durch das Geschlecht der Hunde beeinflusst werden. Bei der Beurteilung der Hüftgelenkdysplasie sollten diese Besonderheiten berücksichtigt werden.

3.1.7 Magnetresonanztomografie des Kniegelenks nach Tibia Plateau Leveling Osteotomy

Studie 7

Feichtenschlager, Ch., Gerwing, M., Failing, K., Peppler, Ch., Kása, A., Kramer, M., **von Pückler, K.H.** (2018):

Magnetic Resonance Imaging Assessment of Intra-Articular Structures in the Canine Stifle Joint after Implantation of a Titanium Tibial Plateau Levelling Osteotomy Plate.

Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology; 31: 261–272.

Die Ruptur des kranialen Kreuzbandes ist einer der häufigsten Gründe für eine Lahmheit der Hintergliedmaßen beim Hund (Johnson et al., 1994). Die (meist degenerative) Zerreißung der Fasern führt bei Belastung des Gelenkes zu einer kranialen Subluxation der Tibia. Es besteht eine Vielzahl an chirurgischen Therapieoptionen, eine der am häufigsten eingesetzten Methoden ist die „Tibial Plateau Leveling Osteotomy“ (TPLO) (Fitzpatrick et al., 2010; Gatineau et al., 2011). Eine der häufigsten Komplikationen nach Kreuzbandriss ist die Meniskopathie, die bei bis zu 13% der Patienten auch nach einer Operation auftreten kann (Pacchiana et al., 2003; Thieman et al., 2006; Cook et al., 2010). In manchen Fällen bleibt hierdurch postoperativ eine Lahmheit bestehen (Case et al., 2008). Eine genauere Evaluation des Meniskus ist in diesen Fällen durch eine Arthroskopie oder Arthrotomie möglich. Bei Meniskusläsionen, die nicht oberflächlich gelegen sind, ist diese Beurteilung limitiert und eine magnetresonanztomografische Untersuchung ist das Mittel der Wahl zur Darstellung der Menisken (Oei et al., 2007; Blond et al., 2008). Besonders bei Patienten, die postoperativ eine deutliche Lahmheit zeigen, können Veränderungen im Weichteilgewebe mithilfe dieser Technik untersucht werden (Halland et al., 2007; Kaiser et al., 2016).

Ein deutlicher Nachteil der MRT ist die besondere Empfindlichkeit der Bildentstehung in Hinblick auf Störungen des Hauptmagnetfeldes durch magnetische oder para- bzw. diamagnetische Stoffe. Bei Implantaten in Gelenknähe ist das Auftreten von Suszeptibilitätsartefakten wahrscheinlich (Hargraeves et al., 2011). In der Vergangenheit haben mehrere Studien die Frage der postoperativen MRT-Untersuchung am Kniegelenk des Hundes betrachtet. Es konnte festgestellt werden, dass TPLO-Implantate aus Stahl deutliche Artefakte hervorrufen und eine Beurteilung der intraartikulären Strukturen daher nicht möglich war (David et al., 2012). Weitere Studien, die Untersuchungen post-TTA durchgeführt haben, konnten zeigen, dass die Artefakte bei titanbasierten Implantaten deutlich geringer waren und eine Beurteilung der intraartikulären Strukturen stattfinden konnte (Barett et al., 2009; Taylor-Brown et al., 2014). Beim Einsatz von Titanimplantaten wurde das Vorkommen von Implantatinfektionen seltener verzeichnet und es zeigte sich eine deutlich größere Biokompatibilität als bei herkömmlichen Stahlimplantaten (Pieske et al., 2008, Sultans et al., 2008).

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, die Beurteilbarkeit intraartikulärer Strukturen in der MRT-Untersuchung (1.0 Tesla) nach TPLO-Implantation zu evaluieren.

Für die Studie wurden 26 Hintergliedmaßen von 13 verstorbenen Hunden untersucht. In die Untersuchung wurden Hunde mit einem Körpergewicht von > 25 kg (25,8–39,5 kg) eingeschlossen. Die Kniegelenke wurden initial im Röntgen im kraniokaudalen und mediolateralen Strahlengang untersucht, um Arthrosen oder andere Veränderungen auszuschließen und den Tibiaplateauwinkel in Vorbereitung auf die Osteotomie zu bestimmen (Median 26° mit Spanne von 22–29°). Die Präparate wurden bei –20°C gelagert und vor der jeweiligen Untersuchung über einen Zeitraum von 24 h aufgetaut.

Vor und nach der Implantation wurde eine standardisierte MRT-Untersuchung (1.0 Tesla Magnetresonanztomograf; Gyroscan Intera; Philips, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

Nach der initialen Untersuchung wurde eine TPLO-Operation mit einem Titanimplantat durchgeführt (Litos tifix; litos/GmbH, Ahrensburg, Deutschland). Das Implantatsystem schloss eine Verriegelungsplatte (60 mm lang, 20 mm breit und 4 mm hoch) sowie 4,0 mm selbstverriegelnde Titanschrauben ein. Die Schraubenlänge wurde der entsprechenden Tibiaanatomie angepasst.

Bei der Implantation wurden zwei unterschiedliche Plattenpositionen nach zufälliger Einteilung der Präparate in zwei Gruppen verwendet: In der ersten Gruppe wurden die Implantate so eingebracht, dass das proximale Ende des Implantats mit der Ebene der Gelenkfläche abschloss. In der zweiten Gruppe wurde das Implantat so weit wie möglich distal angebracht. Besondere Sorgfalt wurde darauf gelegt, das Implantat ohne intraartikuläre Beteiligung und ohne Implantation in den Osteotomiespalt zu fixieren. Nach der Operation wurden Röntgenbilder im mediolateralen und kraniokaudalen Strahlengang angefertigt, um die Position der Implantate zu verifizieren und den postoperativen Winkel des Tibiaplateaus zu bestimmen (median 5°; 3–9°).

Für die postoperative MRT-Untersuchung kamen die gleichen Sequenzen wie bei der Voruntersuchung zum Einsatz. Nach der Implantation orientierte sich das Titanimplantat entlang der Tomografen-Längsachse und damit in Richtung des Hauptmagnetfeldes. Die Befunde wurden in Konsens von einem Diplomate des European College of Veterinary Diagnostic Imaging und einem Resident des European College of Veterinary Surgery unter Zuhilfenahme einer DICOM Software (OsiriX v.3.9.1; Pixmeo Sarl, Geneva, Switzerland) durchgeführt. In die Beurteilung flossen die umliegenden Weichteilstrukturen wie z.B. die Patellarsehne und die Muskulatur mit ein. Zusätzlich wurden alle intraartikulären Strukturen sowie die Gelenkkapsel untersucht. Die knöchernen Strukturen wurden in Regionen unterteilt. Auch die Beurteilung der Gelenkknorpel floss in die Auswertung ein. Bei der postoperativen Beurteilung der Strukturen wurden die Suszeptibilitätsartefakte besonders festgehalten. Hierfür kam ein Graduierungsschema zum Einsatz (Grad 0–5).

Die statistische Auswertung setzte sich aus einem deskriptiven Anteil und vergleichenden Analysen zusammen. Hierbei kamen ein Friedman-Test und ein exakter Wilcoxon-Test sowie Rangkorrelationen nach Spearman zum Einsatz. Die Untersuchungen wurden mithilfe der Software BMDP (Dynamic, Release 8.1; StatXact Version 9.0.0) durchgeführt. Dabei galt ein p-Wert < 0,05 als signifikant.

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass ein signifikanter Einfluss der Sequenzwahl auf die Beurteilbarkeit der Weichteilstrukturen in der MRT besteht.

In der T2-gewichteten, sagittal orientierten Turbospinecho-Sequenz konnten die Kreuzbänder und das kaudale Horn des medialen Meniskus in allen Fällen befundet werden. In Protonendichte-gewichteten Sequenzen und der T1-gewichteten Spinecho-Sequenz war dies bei 22% der Fälle nicht möglich. Das häufigste Auftreten von Artefakten in der Muskulatur war bei Spinecho-Sequenzen in T1-gewichteten Bildern feststellbar. Der M. popliteus war in keiner Sequenz artefaktfrei darstellbar. Sagittal orientierte Gradientenecho-Sequenzen zeigten eine deutliche Reduktion der Bildqualität durch Artefakte.

Hinsichtlich der Position der Implantate ergab sich im T2-gewichteten Turbospinecho kein signifikanter Einfluss der Artefakte. In der sagittal orientierten Protonendichte-, T1-gewichteten und in der Wasser-selektiven WATS-Sequenz wurde die Beurteilung mehrerer Strukturen signifikant beeinflusst. In dorsal orientierten Sequenzen waren STIR und T1-gewichteten Sequenz für die Beurteilung des kaudalen Meniskus signifikant beeinflusst. Die Sequenzen, deren Wertigkeit am häufigsten durch die Plattenposition beeinflusst wurde, waren das T2-gewichtete Gradientenecho und die B-FFE (Balanced Fast Field Echo)-Sequenz. Das Suszeptibilitätsartefakt zeigte in der B-FFE die deutlichste Ausprägung mit Ausdehnung von multiplen halbkreisförmigen Signalstörungen, die sich zu einem „Blumen“-ähnlichen Areal überlagerten.

In dorsal orientierten Sequenzen zeigten sich signifikante Unterschiede für das kraniale Horn des lateralen Meniskus und den kaudalen Anteil des lateralen Meniskus mit $p = 0,015$ und für den kranialen und kaudalen Anteil des medialen Meniskus mit $p < 0,0001$ und für den M. popliteus von $p = 0,002$.

Die Beurteilung der knöchernen Strukturen wurde besonders durch den Implantatsitz beeinflusst und eine Beurteilung der direkt angrenzenden Strukturen war durch hochgradige Suszeptibilitätsartefakte in allen Ebenen und Sequenzen nicht möglich.

In T2-gewichteten Turbospinecho-Sequenzen war eine Beurteilung der medialen Kortikalis häufiger möglich (81%) als die der lateralen (73%).

Außer an der medialen Kortikalis in sagittal orientierten T1-gewichteten Sequenzen war die Beurteilung der lateralen und medialen Kortikalis signifikant von der Implantatposition abhängig.

Die einzige anatomische Struktur, die keine signifikante Beeinflussung zeigte, war die Patella ($p = 0,5494$).

Im Vergleich zu anderen sagittal orientierten Sequenzen konnten in der T2-gewichteten, sagittal orientierten Sequenz große Teile des Gelenkknorpels identifiziert werden (medial 88% und lateral 85%). Die WATS- ($p = 0,0923$) und die T1-gewichtete Turbospinecho-Sequenz ($p = 0,2855$) waren die einzigen Sequenzen, die keinen signifikanten Einfluss des Implantatsitzes zeigten. In allen anderen sagittalen und in dorsalen STIR-Sequenzen war die Beurteilung des Knorpels durch die Implantate beeinflusst. In Hinblick auf die unterschiedlichen Knorpelstrukturen ergab sich ein signifikanter Effekt der Sequenz in der sagittalen Orientierung ($p < 0,0001$). In den dorsal orientierten Untersuchungen ergab sich ein signifikanter Einfluss der Sequenz außer am lateralen Femurcondylus ($p = 0,125$).

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass in T2-gewichteten sagittal orientierten Sequenzen wenig störende Artefakte auftraten, während die deutlichste Ausprägung der Artefakte in B-FFE-Sequenzen feststellbar war.

Die Studie zeigt, dass besonders die Anwendung von Turbospinecho-Sequenzen bei 1 Tesla Magnetfeldstärke hilfreich bei der Beurteilung der intraartikulären Strukturen am kaninen Kniegelenk nach TPLO war. Vorangegangene Studien berichteten von ausgedehnten Suszeptibilitätsartefakten durch stahlbasierte Implantate (David et al., 2012). Das in der vorliegenden Studie eingesetzte Titanimplantat zeigte diesbezüglich positive Eigenschaften, da die relativ geringe Ausprägung der Artefakte eine Beurteilung des Kniegelenks in vielen Aspekten zuließ.

Die MRT ist eine nichtinvasive Möglichkeit, mehr Informationen über das Kniegelenk zu sammeln (Sage et al., 2016). Die Untersuchungssequenzen, die für die vorgestellte Studie zum Einsatz kamen, entsprechen klinischen Standardsequenzen. Diese schließen in der Regel T2-gewichtete, T1-gewichtete, Protonendichte-gewichtete und fettunterdrückte Sequenzen in sagittaler und dorsaler Orientierung ein (Sage et al., 2016). Während T2-gewichtete Sequenzen besonders für die Beurteilung intraartikulärer Weichteilstrukturen geeignet sind, können T1-gewichtete Sequenzen dabei helfen, die knöchernen Strukturen und Bänder genauer zu beurteilen. Die Protonendichtegewichteten Sequenzen sind besonders für die Darstellung der Menisken und anatomische Details hilfreich (Blond et al., 2008).

Die besonders geringe Artefaktanfälligkeit der T2-gewichteten Turbospinecho-Sequenz kann auf die wiederholten Refokussierungspulse zurückgeführt werden. Ein zusätzlicher Zusammenhang zwischen den spezifischen Sequenzparametern (inkl. Schichtdicke) und der geringen Artefaktanfälligkeit ist denkbar. Die T2-gewichtete Gradientenecho-Sequenz wurde in die vorliegende Studie eingeschlossen, da diese von vorangegangenen Studien als hilfreich im Hinblick auf die Beurteilung der Menisken beschrieben wurde. Die Sequenzstruktur macht Gradientenecho-Sequenzen jedoch besonders anfällig für Störungen des Hauptmagnetfeldes Sage et al., 2016).

Fettunterdrückte Sequenzen werden vor allem dazu eingesetzt, aktive und ödematöse Prozesse genauer darzustellen. Besonders in Hinblick auf Knochenödeme ist die STIR-Sequenz hilfreich. Auch die Orientierung des Implantats in Relation zum Hauptmagnetfeld des Topografen beeinflusst die Ausprägung von Artefakten signifikant (Guermazi et al., 2003).

Wie vorangegangene Studien konnte die hier vorgestellte Studie zeigen, dass die Artefakte, die durch ein Titanimplantat verursacht werden, in der Regel eine Interpretation der Menisken und Bänder zulassen (Suh et al., 1998; Barrett et al., 2009; David et al., 2012; Jones et al., 2017). In einer Ex-vivo-Studie konnte am Beispiel eines Hüftendoprothese-Implantats gezeigt werden, dass durch Titan eine 70%ige Artefaktreduktion stattfindet (Sutherland-Smith et al., 2012).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die MRT besonders beim Einsatz von Turbospinecho-Sequenzen (T1-, T2- und Protonendichte-gewichtet) ein hilfreiches Mittel zur Diagnostik am Kniegelenk auch nach TPLO darstellt. Die Beurteilbarkeit der intraartikulären Strukturen hängt signifikant von der Implantatposition ab. Gradientenechosequenzen zeigten sich bei einer Magnetfeldstärke von 1 Tesla als weitgehend ungeeignet zur Beurteilung der meisten Strukturen, besonders der Gelenkstrukturen und besonders, wenn das Implantat nahe des Gelenkspalts angebracht wurde.

3.1.8 Abschließende Betrachtung

Die MRT-Untersuchung mithilfe von Tomografen, die eine klinisch anwendbare Feldstärke von 1 Tesla aufweisen, ist dazu geeignet, Bandscheibendegenerationen beim Hund semiquantitativ zu beurteilen. Es hat sich gezeigt, dass Deutsche Schäferhunde eine rassespezifische Konformation der Lendenwirbelsäule, des lumbosakralen Übergangs und des Kreuzbeins aufweisen. Auch die Degeneration der lumbosakralen Bandscheibe weist eine signifikante Korrelation mit der Rasse auf. Zusätzlich bietet die Kombination aus unterschiedlichen MRT-Sequenzen sowohl im Hochfeld als auch im Niederfeldsystem die Möglichkeit, Muskulotendinopathien zu diagnostizieren und in unterschiedliche Erkrankungsstadien einzuteilen. Bei der Muskulotendinopathie des M. gastrocnemius kann festgestellt werden, dass die Erkrankung nicht auf Hütehunde begrenzt ist und auch bei Hunden anderer Rassen als Differenzialdiagnose bei Lahmheit der Hintergliedmaßen in Betracht gezogen werden sollte. Auch bei der röntgenologischen Morphologie des caninen Hüftgelenks lassen sich deutliche Rasseunterschiede feststellen. Diese sollten bei zukünftigen Beurteilungen hinsichtlich Dysplasie berücksichtigt werden. Eine weitere diagnostische Herausforderung stellt die postoperative Beurteilung von Gelenkstrukturen dar. Die vorliegende Studie zeigt, dass auch nach Implantation eines Titanimplantats die Beurteilung intra- und periartikulärer Strukturen am caninen Kniegelenk möglich ist.

3.2 Bildgebende Diagnostik der Ellenbogengelenkdysplasie und ihre Herausforderungen

Studie 8

Rau, F.C., Wigger, A., Tellhelm, B., Zwick, M., Klumpp, S., Neumann, A., Oltersdorf, B., **Amort, K.**, Failing, K., Kramer, M. (2011):
Observer variability and sensitivity of radiographic diagnosis of canine medial coronoid disease. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere*; 39(5): 313–322.
DOI: 10.1055/s-0038-1623595

Studie 9

Klumpp, S., Ondreka, N., **Amort, K.**, Zwick, M., Gesierich, K., Engert, M., Tacke, S., Failing, K., Kramer, M. (2010):
Diagnostic value of CT and MRI for the diagnosis of coronoid pathology in the dog. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere*; 38(1): 7–14.
DOI: 10.1055/s-0038-1622827

Studie 10

Zweifel, R.T., DiDonato, P., Hartmann, A., Kramer, M., **von Pückler, K.H.** (2020):
Improved Computed Tomography Accuracy with a 1-mm versus 2- or 3-mm Slice Thickness for the Detection of Medial Coronoid Disease in Dogs. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*; 33(1): 45–50.
DOI: 10.1055/s-0039-3399524

Studie 11

Wennemuth, J., Tellhelm, B., Eley, N., **von Pückler, K.** (2020):
Computed Tomography Enhances Diagnostic Accuracy in Challenging Medial Coronoid Disease Cases: An Imaging Study in Dog Breeding Appeal Cases. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*; 33(5): 356–362.
DOI: 10.1055/s-0040-1714299

Studie 12

Holbein, L.M., **von Pückler, K.H.**, Kramer, M., Failing, K., Kirsch, M. (2020):
Computertomografische Morphologie des Ellbogengelenks und Vorkommen der Ellbogengelenkdysplasie beim Rotfuch (*Vulpes vulpes*). *Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/ Heimtiere*; 48(3): 176–185.
DOI:10.1055/a-1162-1273

Einleitung

Die Ellenbogengelenkdysplasie (ED) ist eine der häufigsten orthopädischen Erkrankungen bei jungen Hunden mittelgroßer und großer Hunderassen. Sie führt oft zur Entstehung von Arthrosen und ist ein Grund für Lahmheit bei jungen Hunden (Grøndalen et al., 1981; Cook und Cook, 2009; Holbein 2020). Die Definition der Ellenbogengelenkdysplasie schließt mehrere Grunderkrankungen ein. Hierzu gehören die Koronoiderkrankung (inkl. fragmentierten Processus coronoideus medialis ulnae [PCM] oder dessen Fissur), der isolierte Processus anconaeus, die Osteochondrose der Trochlea humeri und die Inkongruenz des Ellenbogengelenks (International Elbow Working Group [IEWG], 1989). Der Begriff der „Koronoiderkrankung“ („Medial coronoid disease“) wurde von Moores et al. (2008) geprägt, um das gesamte Spektrum möglicher pathologischer Veränderungen am inneren Kronfortsatz abzubilden (Moores et al., 2008; Fitzpatrick et al., 2009). Unterschiedliche Ursachen einer Chondropathie mit avitaler Spitze, Fissur oder Fragment am inneren Kronfortsatz werden diskutiert (Cook und Cook, 2009). Auch nekrotische bzw. avaskuläre Veränderungen sind beschrieben und können Ursache der Knochenveränderung sein (Van Ryssen et al., 1997; Vermote et al., 2010). Hinzu kommen Erosionen des medialen Gelenkanteils (Vermote et al., 2010).

Es besteht eine deutliche erbliche Komponente der einzelnen Erkrankungen im Komplex der Ellenbogengelenkdysplasie, wobei ein polygenetischer Erbgang als Grundlage gilt (Janutta et al., 2006; Temwichitr et al., 2010). Die Erblichkeit einzelner Komponenten scheint bei unterschiedlichen Hunderassen unterschiedlich ausgeprägt und bisher besteht keine flächendeckende Möglichkeit eines genetischen Screenings (Janutta et al., 2008).

Aus diesem Grund werden bei der Prävention, Diagnostik und Therapiekontrolle Verfahren eingesetzt, die sich auf phänotypische Merkmale stützen. Hier kommt bei Zuchtuntersuchungen in der Regel das Röntgen zum Einsatz (Vorhoot et al., 1987; Berry et al., 1992). Kriterien zur Einstufung des Röntgenbefunds werden z.B. von der International Elbow Working Group (IEWG) formuliert.

Der Vorteil der Röntgenuntersuchung als Screeningverfahren liegt in der flächendeckenden Verfügbarkeit der Technik, der geringen Untersuchungsdauer und der vergleichsweise geringen Strahlenbelastung. Die diagnostische Genauigkeit des Screenings bei der Begutachtung der Bilder durch Untersucher mit unterschiedlichem Erfahrungsgrad wurde von Rau et al. (2011) beschrieben. Die Beurteilung der Röntgenbilder ist jedoch durch die Überlagerung der Gelenkstrukturen im Bild limitiert. Hinzu kommt, dass zur genauen Beurteilung langjährige Erfahrung notwendig ist, die den Untersuchenden möglicherweise fehlt (Rau et al., 2011). Die genannte Überlagerung der Strukturen kann durch das Anfertigen einer CT-Untersuchung vermieden werden (Villamonte-Chevalier et al., 2015). Daher ist die CT als weiteres diagnostisches Mittel in fraglichen Fällen, die im Rahmen der Zuchtzulassung beurteilt wurden, durch einige Zuchtvereine zugelassen. Zusätzlich kommt die CT bei Hunden mit Ellenbogengelenk-Lahmheiten zum Einsatz (Cook und Cook, 2009).

Neben der besseren Darstellung von morphologischen Veränderungen bringt die CT eine weitere Möglichkeit zur Beurteilung mit sich: Die Knochendichte kann mithilfe einer Software zur Darstellung der Hounsfield-Einheiten (semiquantitativ) bestimmt werden. Eine Veränderung der Knochendichte ist laut vorangegangenen Untersuchungen direkt mit einer Koronoiderkrankung korre-

liert (Villamonte-Chevalier et al., 2016, Holbein, 2020). Um die diagnostische Genauigkeit in Hinblick auf das Erkennen von Chondropathien zu erhöhen, wurde die Wertigkeit der Magnetresonanztomografie für die Darstellung des Ellenbogengelenks, besonders in Hinblick auf die Dysplasie mit Koronoidveränderungen, untersucht (Klumpp et al., 2010).

3.2.1 Röntgendiagnostik zur Beurteilung der Koronoiderkrankung: Einfluss der Untersucherexpertise auf Variabilität und Sensitivität der Befunde

Studie 8

Rau, F.C., Wigger, A., Tellhelm, B., Zwick, M., Klumpp, S., Neumann, A., Oltersdorf, B., **Amort, K.**, Failing, K., Kramer, M. (2011):

Observer variability and sensitivity of radiographic diagnosis of canine medial coronoid disease. Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere; 39(5): 313–322.

In einigen Untersuchungen zeigt sich die Diagnostik der Ellenbogengelenkdysplasie im Röntgen als herausfordernd und andere Modalitäten wie CT und MRT zeigen sich überlegen (Carpenter et al., 1993; Snaps et al., 1997).

Dennoch bleibt die Röntgenuntersuchung aufgrund der guten Verfügbarkeit und der geringen Kosten das wichtigste Mittel zur Screening-Untersuchung der Ellenbogengelenkdysplasie. Auch die IEWG schlägt die Röntgenuntersuchung als Routinediagnostikum vor (Tellhelm, 2010).

In der Beurteilung der Röntgenbilder ist besonders die Beurteilung des inneren Kronfortsatzes durch die Überlagerung mit anderen anatomischen Strukturen wie dem Radiuskopf limitiert (Carpenter et al., 1993; Wosar et al., 1999; Haudiquet et al., 2002; Groth et al., 2009).

Aus diesem Grund werden auch die sekundären Arthrosen in die Beurteilung der Ellenbogengelenkdysplasie integriert (Lang et al., 1998). Zusätzliche Kriterien beinhalten die Abgrenzbarkeit des inneren Kronfortsatzes sowie die Sklerose an seiner Basis (Burton et al., 2008; Draffan et al., 2009).

Basis der vorliegenden Studie war die Annahme, dass die Beurteilung der Röntgenbilder in Hinblick auf das Vorliegen einer Ellenbogengelenkdysplasie deutlich vom Training und der Erfahrung des Untersuchers abhängt. Ziel war es, die Sensitivität von Auswertenden mit unterschiedlichem Ausbildungsstand im Rahmen einer inter- und intraobserver Studie zu vergleichen. Als Vergleich dienten sowohl Computertomografie als auch Arthroskopie.

Die Studie sollte klären, ob die Sensitivität der Auswertung und die Übereinstimmung mit der CT-Diagnose mit dem Erfahrungsgrad des Auswertenden korrelieren. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob ein steigender Erfahrungsgrad eine bessere inter- und intraobserver Übereinstimmung nach sich zieht.

In die Studie wurden Röntgenbilder von Hunden eingeschlossen, die in den Jahren 2007 und 2008 aufgrund einer Lahmheit der Vordergliedmaßen in der Klinik für Kleintiere der Justus-Liebig-Universität Gießen vorgestellt wurden und neben Röntgenbildern der Ellenbogen zusätzlich eine computertomografische und arthroskopische Untersuchung der Ellenbogengelenke erhalten hatten. Vier Untersuchende mit unterschiedlichem Erfahrungsgrad wurden in Hinblick auf Sensitivität, Spezifität und inter- und intraobserver Übereinstimmungen evaluiert. Die Röntgenbilder wurden in Hinblick auf osteophytäre Veränderungen und das Vorliegen einer Koronoiderkrankung ausgewer-

tet. Für die Beurteilung der intraobserver Übereinstimmung wurden 60 der Röntgenbilder im Abstand von 2 Wochen ein weiteres Mal ausgewertet. Die Auswertung wurde in Anlehnung an das von der IEWG vorgeschlagene Schema der FCI durchgeführt (Tellhelm, 2010).

Die CT-Untersuchung erfolgte mithilfe eines 16-Zeilen-Computertomografen (Brilliance CT, Phillips, Hamburg, Germany). Das Tier befand sich in Rückenlage mit gestreckten Vordergliedmaßen und wurde mit CT-StandardEinstellungen für die Beurteilung der Ellenbogengelenke (200 mAs, 140 kV, 1 mm Schichtdicke) untersucht. Ein Untersucher beurteilte die CT-Untersuchungen in Hinblick auf das Vorliegen der Kriterien einer Ellenbogengelenkdysplasie.

Die arthroskopische Untersuchung wurde von erfahrenen Chirurgen durchgeführt und mittels Video und Standbildern dokumentiert. Eine zusätzliche Auswertung erfolgte durch einen orthopädischen Chirurgen anhand der gespeicherten Bilddaten. Sensitivität und Spezifität der Röntgenauswertungen durch jeden einzelnen Auswertenden wurden im Anschluss auf Basis der CT- und Arthroskopieergebnisse ermittelt. Zur Ermittlung der inter- und intraobserver Werte wurde Cohen's Kappa (κ) herangezogen (BMDP/Dynamic Statistical Software Release 8.2 BMDP4F).

In die Studie gingen 102 Ellenbogengelenke von 65 Hunden ein. Das mittlere Alter betrug 14 Monate (5–122) und das mittlere Körpergewicht der Hunde lag bei 32 kg (19–56 kg). Fünfundvierzig Hunde und 20 Hündinnen wurden untersucht. Es gingen Hunde aus 17 Rassen in die Studie ein, wobei ein großer Teil der Patienten Labrador Retriever, Golden Retriever und Rottweiler waren. Viele Tiere zeigten eine beidseitige Erkrankung der Ellenbogen (78,5%). Von 102 Gelenken waren 90,2% in der Arthroskopie als erkrankt diagnostiziert. Bei 78,4% konnten Fragmente am inneren Kronfortsatz festgestellt werden. Bei 12,7% konnten ausschließlich Knorpelveränderungen festgestellt werden.

In der CT wurden 100 von 102 Ellenbogen als erkrankt befundet. Bei der Beurteilung durch die 4 Auswertende variierte die Röntgendiagnose von 19 bis 95 Ellenbogen. Auch bei den übrigen Beurteilungen zeigte sich eine deutliche Varianz. Das galt ebenso für die Ausprägung der osteophytären Zubildungen in der Röntgenbeurteilung.

Die Sensitivität bei der Beurteilung der Koronoiderkrankung war beim Auswertenden mit dem größten Erfahrungsgrad am höchsten mit 96,7%. Mit geringer werdendem Erfahrungsgrad sank die Sensitivität von 92,4% nach 80,4% und 77,2%. Die Spezifität war mit 40% für die beiden erfahreneren Auswertenden am höchsten, gefolgt von 20% und 10%.

Die Sensitivität und Spezifität der CT bei der Detektion von Fragmenten betrug 70 und 60,9%. Wenn Fragmente im Röntgen festgestellt werden konnten, war die Spezifität hoch (82,5–98,4%). Beim Vergleich der Auswertenden in Hinblick auf die Diagnostik der Koronoiderkrankung (vorhanden: ja/nein?) zeigte sich die beste Übereinstimmung bei den beiden erfahrenen Auswertenden mit einem Wert von $\kappa = 0,74$, während die Übereinstimmung der übrigen Auswertenden nur gering war ($\kappa = 0,07$ – $0,42$). Die beiden wenig erfahrenen Auswertenden zeigten eine Übereinstimmung von $\kappa = 0,42$.

Bei der Untersuchung der Wiederholbarkeit und Konsistenz der Ergebnisse zeigten die erfahreneren Auswertenden sehr gute Übereinstimmungen mit $\kappa = 0,73$ und $0,88$, während die Übereinstimmung bei den weniger Erfahrenen deutlich geringer ausfiel ($\kappa = 0,31$ – $0,42$).

Sowohl in Hinblick auf die inter- als auch intraobserver Vergleiche änderten sich die Ergebnisse nur minimal, wenn statt zwei Kategorien (Koronoiderkrankung ja/nein?) als dritte Kategorie zusätzlich der „Verdacht“ auf eine Koronoiderkrankung integriert wurde.

Die vorgestellte Studie konnte zeigen, dass die Sensitivität der Röntgenbeurteilung (mit der Arthroskopie als Goldstandard) bei Auswertenden mit großer Erfahrung ähnlich hoch war wie die Sensitivität der CT. Die Wiederholbarkeit stieg mit dem Erfahrungsgrad an. Der Auswertende mit der größten Erfahrung zeigte bessere intraobserver Werte als interobserver Werte.

Hinsichtlich der Rassen, des Alters und des Geschlechts der Tiere bildet die Studie vorangegangene Erfahrungswerte aus anderen Studien ab (VanRyssen et al., 1997; Meyer-Lindenberg et al., 2003; Gemmil et al., 2007; Draffan et al., 2009). Auch das bilaterale Auftreten und die überdurchschnittlich häufige Erkrankung bei Retrievern und Rottweilern decken sich mit vorangegangenen Studien (Meyer-Lindenberg et al., 2003; Gemmil et al., 2007; Moores et al., 2008; Draffan et al., 2009). Die Detektionsrate der Veränderungen an den Ellenbogengelenken deckt sich mit vorangegangenen Untersuchungen (Moores et al., 2008).

Bei 54,0–81,4% der Ellenbogen wurde der „Verdacht“ auf eine Koronoiderkrankung geäußert, während die Primärläsion bei 60,0% der Fälle in der CT sichtbar gemacht werden konnte. Da besonders die Spezifität der Röntgenauswertung im Vergleich zur Arthroskopie sehr hoch war, kann davon ausgegangen werden, dass ein sichtbares Fragment im Röntgen ebenfalls in der Arthroskopie vorgefunden wird. Die relativ geringe Spezifität der CT-Untersuchung kann ggf. mit einer „Überinterpretation“ von hypoattenuierenden Arealen und Fissurlinien in der CT erklärt werden. In der vorliegenden Studie war die Sensitivität der Röntgenuntersuchung mit 28,2–38,5% im Vergleich zur vorangegangenen Studie (12,6%) höher (Fitzpatrick et al., 2009). Als Unterschied zwischen den Studien und mögliche Erklärung kann neben der Studienpopulation der Einsatz der kraniokaudalen Projektion mit Pronation genannt werden (Wosar et al., 1999; Haudiquet et al., 2002) sowie der zusätzliche Einsatz von gebeugten und gestreckten mediolateralen Aufnahmen. Auch bei der reinen Detektion von Koronoidveränderungen zeigt die vorliegende Studie eine deutlich höhere Sensitivität mit 77,2–96,7% (Carpenter et al., 1993; Wosar et al., 1999; Haudiquet et al., 2002).

In einigen Fällen (30%) konnte festgestellt werden, dass eine Koronoiderkrankung vorlag, ohne dass sekundär arthrotische Veränderungen feststellbar waren. Die osteophytären Veränderungen können daher nicht als alleiniges Merkmal zur Röntgenbeurteilung herangezogen werden. Auch die Berücksichtigung der Sklerose an der Basis des inneren Kronfortsatzes verbessert die diagnostische Genauigkeit und spielt besonders bei Fällen, die keine weiteren Osteophyten aufweisen eine wichtige Rolle als Hinweis auf eine Veränderung des Ellenbogengelenkes. Der Grad der Sklerose korreliert dabei mit der Ausprägung der Koronoiderkrankung. In einer Studie, die dieses Röntgenkriterium bei Belgischen Schäferhunden untersucht hat, zeigte sich, dass die Sklerose mit einer Sensitivität von 80% und einer Spezifität von 90% ein relativ verlässliches Zeichen der Ellenbogengelenkdysplasie war (Lappalainen et al., 2009). In der vorliegenden Studie wurde die Sklerose nicht gesondert, sondern als Teil der Arthrose betrachtet, sodass die Beurteilung der Sklerose indirekt einfluss.

In der vorgestellten Studie zeigte sich eine gute Übereinstimmung zwischen den erfahrenen Auswertenden. Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die verlässlichere Einschätzung der Röntgenkriterien zurückzuführen. Zusätzlich führt Erfahrung zu einer besseren Wiederholbarkeit.

Eine weitere Studie konnte zeigen, dass ein unauffälliges Röntgenbild auch bei Hunden vorliegen kann, die an einer Koronoiderkrankung leiden (Punke et al., 2009). Diese Limitation der Röntgenauswertung erklärt die relativ geringe Sensitivität der Untersuchung.

Selbst wenn die Computertomografie keine Auffälligkeiten aufweist, kann die pathohistologische Untersuchung des Gelenks Veränderungen aufweisen. Eine absolut sichere Diagnose ist daher mit bildgebenden Verfahren nicht möglich (Tromblee et al., 2007).

Die vorliegende Studie weist Limitationen durch ihren retrospektiven Charakter auf. Die Arthroskopie kann nur eingeschränkt als Goldstandard betrachtet werden. Da es sich um klinische Patienten handelte, war eine pathohistologische Untersuchung jedoch nicht möglich. Eine Kombination aus CT und Arthroskopie scheint laut einer Arbeit von Moores et al. (2008) als Goldstandard jedoch gut einsetzbar und wurde daher in der vorliegenden Studie gewählt.

Aufgrund der Notwendigkeit der Arthroskopie als Basis gingen in die Studie hauptsächlich erkrankte Gelenke ein. Weitere Untersuchungen mit einer größeren Anzahl an klinisch unauffälligen Hunden wäre zur Validierung der hier vorliegenden Ergebnisse sinnvoll. Ein weiterer Faktor, der zu berücksichtigen ist, ist die subjektive Einschätzung der Arthroskopie durch den Auswertenden und der Einfluss der unterschiedlichen Untersuchenden in der Arthroskopie.

Die vorliegende Studie bestätigt die Vermutung, dass Übung und Erfahrung die Sensitivität, Spezifität und Wiederholbarkeit der Beurteilung von Ellenbogengelenken in Hinblick auf die Ellenbogengelenkdysplasie, spezifisch die Koronoiderkrankung, deutlich verbessern.

Um das Röntgen als optimales Screeningverfahren im Rahmen der Zucht oder als Diagnostik bei lahmen Patienten einzusetzen, sind Erfahrung und Training essenziell.

3.2.2 Diagnostische Wertigkeit von CT und MRT bei der Diagnose der Koronoiderkrankung des Hundes

Studie 9

Klumpp S., Ondreka N., **Amort K.**, Zwick M., Gesierich K., Engert M., Tacke S., Failing K., Kramer M. (2010):

Diagnostic value of CT and MRI for the diagnosis of coronoid pathology in the dog.

Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere; 38(1): 7–14.

Im Vergleich zur konventionellen Radiografie hat sich die Computertomografie (CT) für die Diagnose der Ellenbogengelenkdysplasie als verlässlicheres Verfahren gezeigt. Die CT zeigt eine hohe Sensitivität für die Diagnostik von Fragmenten am inneren Kronfortsatz und damit auch eine häufigere Detektion der Ellenbogengelenkdysplasie (Carpenter et al., 1983; Reichle et al., 2000; Rovesti et al., 2002).

Die CT hat die überlagerungsfreie Darstellung der Strukturen als Vorteil. Nachteil der CT ist die fehlende Darstellung des Gelenkknorpels. Aus diesem Grund wird sie in der Regel durch die Befunde aus der Arthroskopie ergänzt (van Ryssen et al., 1997; van Bree et al., 1998; Meyer-Lindenberg et al., 2003; Mores et al., 2008).

Die Magnetresonanztomografie hat sich gleichzeitig mit der Computertomographie in der Diagnostik am Bewegungsapparat sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin etabliert. Snaps et al. (1997) haben die Wertigkeit der MRT des Ellenbogens im Vergleich zur Arthrotomie betrachtet und konnten feststellen, dass die MRT bei fraglichen Röntgenbefunden zusätzliche Informationen brachte (Snaps et al., 1997; Snaps et al., 1998).

Die vorgestellte Studie vergleicht CT und MRT bei der Diagnostik der Ellenbogengelenkdysplasie mit Fokus auf der sog. Koronoiderkrankung. Die in der Studie untersuchten Tiere wurden als Patienten in der Klinik für Kleintiere der Justus-Liebig-Universität vorgestellt. Alle Hunde wurden in der CT, der MRT und mittels Arthroskopie untersucht.

Die CT-Untersuchung erfolgte mittels eines 16-Zeilen-Computertomografen (Philips Brilliance 16) in einem standardisierten Verfahren. Die Patienten wurden in Rückenlage verbracht und mit getreckten Gliedmaßen untersucht (140 kV, 1 mm Schichtdicke). Die MRT-Untersuchung wurde mithilfe eines MR-Tomografen mit einer Magnetfeldstärke von 1 Tesla (Philips Intera, 1.0) durchgeführt. Das Untersuchungsprotokoll wurde hinsichtlich der angewandten Sequenzen aus der Humanmedizin übertragen und an die Hundeanatomie angepasst. Im Anschluss erfolgte die arthroskopische Untersuchung.

Im Anschluss wurden die Bilddaten von einem Untersucher in Hinblick auf Veränderungen am inneren Kronfortsatz, Strukturveränderungen an der Kronfortsatzbasis und Knochenstruktur des inneren Kronfortsatzes untersucht. Dichtewerte wurden mittels CT bestimmt.

Die erhobenen Daten wurden mit dem Program BMDP/Dynamic (BMDP Statistical Software Inc; Release 7.0) untersucht und im Rahmen einer dreidimensionalen Häufigkeitsauszählung mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ betrachtet.

In die Studie wurden die Untersuchungen von 44 Gelenken eingeschlossen. Die am häufigsten betroffenen Rassen waren Labrador Retriever (38,6%), gefolgt von Golden Retrievern (11,4%). Es wurden 30 Rüden und 14 Hündinnen untersucht und das Alter der Hunde lag bei durchschnittlich 2,25 Jahren.

Bei der Untersuchung der Fissur am inneren Kronfortsatz konnte diese häufiger in der CT (66%) als in der MRT (59%) festgestellt werden. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. In der Arthroskopie wurden bei 15 Gelenken (34%) Fissuren festgestellt. Diese Fälle waren 12-mal in der CT und 14-mal in der MRT detektiert worden. Auch hier bestand kein signifikanter Unterschied.

Fragmente wurden bei 24 Hunden (54%) in der CT festgestellt. In der MRT wurden 25 (57%) festgestellt. Bei 4 Gelenken wurden in der CT detektierte Fragmente nicht in der MRT detektiert. Umgekehrt waren 5 Fälle zu verzeichnen. In der Arthroskopie konnten bei 14 Gelenken (32%) Fragmente diagnostiziert werden. Bei 11 Hunden (25%) wurden Fragmente in der CT vermutet, die in der Arthroskopie nicht bestätigt wurden.

Insgesamt war beim Vergleich der MRT- und CT-Untersuchungen kein signifikanter Unterschied feststellbar. Auch mit Bezug auf die Arthroskopie lag kein signifikanter Unterschied zwischen den Modalitäten vor.

Insgesamt zeigt die Studie, dass bei klinisch auffälligen Tieren sowohl in der CT als auch in der MRT diagnostische Untersuchungen erreicht werden konnten.

In der vorliegenden Studie konnten alle in der Arthroskopie erhobenen relevanten Befunde in Hinblick auf eine Fissur auch in den anderen Verfahren erhoben werden. Veränderungen, die in der CT sichtbar waren, konnten teilweise in der Arthroskopie nicht nachgewiesen werden. Die MRT zeigte ähnliche Ergebnisse wie die CT- und die Untersuchung bestätigt damit die Beobachtungen von Snaps et al. (1997), die in ihrer Studie bei 90% der Hunde eine Fissur mithilfe der MRT feststellen konnten. Wie in vorangegangenen Untersuchungen konnte bei der Diagnose eines Fragments auch in der vorliegenden Studie ein Unterschied zwischen den Befunden in der CT, MRT und Arthroskopie festgestellt werden. Der Unterschied zwischen CT und MRT lässt sich durch die Interpretation nichtdislozierter Fragmente als Fissur und vice-versa erklären. Die fehlende Diagnose in der Arthroskopie kann ggf. durch den fehlenden Kontakt der Frakturlinie zur Gelenkfläche erklärt werden. Ähnliche Beobachtungen machten Moores et al. (2008).

Zusammenfassend konnte die hier vorgestellte Studie zeigen, dass sich sowohl MRT als auch CT zur Diagnose von Koronoidveränderungen bei Patienten mit Verdacht auf eine Koronoidpathologie eignen. Die Ergebnisse vorangegangener Studien konnten bestätigt werden (Snaps et al., 1997; Moores et al., 2008).

Speziell entwickelte MRT-Sequenzen und hohe Magnetfeldstärken können in der Magnetresonanztomografie voraussichtlich zu einer genaueren Diagnose beitragen. Mit hohen Feldstärken sind auch dreidimensionale Submillimeter-Darstellungen möglich. Aus diesem Grund kann die Anwendung knorpel-sensitiver Sequenzen in Zukunft weitere Einblicke verschaffen (Klumpt, 2010).

3.2.3 Einfluss der Schichtdicke bei der Beurteilung von CT-Untersuchungen in Hinblick auf die Ellenbogengelenkdysplasie mit besonderer Berücksichtigung der Koronoiderkrankung

Studie 10

Zweifel, R.T., DiDonato, P., Hartmann, A., Kramer, M., **von Pückler, K.H.** (2020):

Improved Computed Tomography Accuracy with a 1-mm versus 2- or 3-mm Slice Thickness for the Detection of Medial Coronoid Disease in Dogs.

Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology; 33: 45–50.

In fraglichen Fällen wird bei der Zuchtuntersuchung auf eine Ellenbogengelenkdysplasie eine zusätzliche computertomografische Untersuchung (CT) angefertigt. Die CT bietet im Vergleich zur Arthroskopie die Möglichkeit, auch subchondrale Veränderungen genauer zu beurteilen und ist gleichzeitig wenig invasiv (Cook und Cook, 2009). Der Einsatz der CT wurde in einigen Studien untersucht (Reichle et al., 1999; Reichle et al., 2000; Kramer et al., 2007; Tromblee et al., 2007). Hinsichtlich der Kriterien zur Anfertigung oder Auswertung der CT-Untersuchung wurden in der Vergangenheit jedoch lediglich Empfehlungen formuliert (Cook und Cook, 2009).

Gegenstand der Studie war die Untersuchung eines grundlegenden technischen Parameters in der CT-Untersuchung. Die Studie verglich Rekonstruktionen mit unterschiedlicher Schichtdicken von CT-Ellenbogenuntersuchungen und den Einfluss der unterschiedlichen Schichtdicken auf die Erhebung von Befunden. In die Beurteilung flossen die CT-Untersuchungen von 28 Hunden ein, die als Patienten an der Klinik für Kleintiere der Justus-Liebig- Universität in Gießen vorgestellt wurden. Die CT-Untersuchungen wurden in drei unterschiedlichen Schichtdicken rekonstruiert und zur Beurteilung lagen in der Folge 168 randomisierte und gebildete CT-Datensätze vor, die von zwei Untersuchenden in Hinblick auf unterschiedliche Befunde im Rahmen der Ellenbogengelenkdysplasie beurteilt wurden. Von allen Hunden lagen zusätzlich arthroskopische Untersuchungen der Gelenke vor. Diese wurden zur Validierung der CT-Ergebnisse herangezogen.

Die Schichtdicke hatte einen signifikanten Einfluss auf die Schärfe und Abgrenzung der Knochenkonturen. Eine 1-mm-Schichtdicke bot eine gute Abgrenzbarkeit während 2- und besonders 3-mm-Schichtdicken zu einer signifikant reduzierten Abgrenzbarkeit der Strukturen führten. Die 1-mm-Rekonstruktion bot zusätzlich die höchste Detektionsrate bei der Beurteilung von Fragmenten am Processus coronoideus medialis ulnae. Ein weiterer Einfluss der Schichtdicke konnte bei der Beurteilung der Fragmentposition, bei der Beurteilung einzelner Fragmente und bei der Detektion von Fissurlinien am Processus coronoideus medialis ulnae festgestellt werden.

Als Schlussfolgerung ist für die Darstellung des caninen Ellenbogengelenks eine Schichtdicke von höchstens 1 mm empfehlenswert. (Diese Empfehlung wurde von der IEWG und GRSK [Gesellschaft für Röntgendiagnostik genetisch beeinflusster Skeletterkrankungen bei Kleintieren e.V] übernommen.)

3.2.4 Computertomografie verbessert die diagnostische Genauigkeit bei schwierig einzustufenden Ellenbogengelenkdysplasie-Fällen

Studie 11

Wennemuth, J., Tellhelm, B., Eley, N., **von Pückler, K.** (2020):
Computed Tomography Enhances Diagnostic Accuracy in Challenging Medial Coronoid Disease Cases: An Imaging Study in Dog Breeding Appeal Cases.
Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology; 33: 356–362.

In der vorliegenden Studie wurde die Genauigkeit der Röntgenbeurteilung in anspruchsvollen Fällen, wie z.B. Obergutachten, untersucht. Als Goldstandard wurde hierbei die CT-Untersuchung herangezogen. Zusätzlich wurden die Begrenzung, Dichte und die Hounsfield-Werte (CT-Dichtewerte) von veränderten und unauffälligen Ellenbogengelenken untersucht. Eine Hypothese der Studie lautete, dass Fissurlinien (im Gegensatz zu Fragmenten) am Processus coronoideus medialis ulnae (PCM) häufiger zu falsch negativen Röntgenbefunden führen, da sie weniger Veränderungen der Dichtewerte und der Begrenzung des Processus coronoideus medialis ulnae verursachen.

Im Rahmen der Untersuchungen wurden Röntgenbilder und CT-Untersuchungen von Hunden, die im Zeitraum von 2010 bis 2015 in der Klinik für Kleintiere der Justus-Liebig-Universität zur Zweitbegutachtung oder zum Anfertigen einer Untersuchung im Rahmen eines sog. Obergutachtens vorstellig wurden, beurteilt. Fälle, die initial in eine Graduierung nach *International Elbow Working Group* (IEWG) Grad 3 eingeteilt worden waren, wurden aus der Studie ausgeschlossen. Nach Anonymisieren der Bilder wurden sowohl Röntgen- als auch CT-Bilder von drei Diplomates des European College of Diagnostic Imaging unabhängig voneinander beurteilt und anschließend eine Konsensus-Beurteilung erstellt.

Ein weiterer Untersucher (Doktorand in Weiterbildung zum Fachtierarzt für Bildgebende Verfahren) fertigte Dichtewertmessungen am Processus coronoideus medialis ulnae aller Hunde an. Als Basis der Beurteilung wurde das Schema nach IEWG herangezogen.

Anschließend wurden die Sensitivität und Spezifität der Röntgenuntersuchung berechnet. Weiterhin wurden Zusammenhänge und Übereinstimmungen der Einzelbefunde untersucht.

In die Studie flossen die Daten von 70 Hunden mittelgroßer und großer Hunderassen ein. Es bestand bei keinem der Hunde eine Lahmheit. Die Ellenbogengelenke wurden einzeln betrachtet. Bei 13 von 140 Ellenbogen wurde in der Röntgenbeurteilung ein falsch positiver Verdacht einer Koronoiderkrankung geäußert. Falsch negative Befunde bestanden bei 10 von 140 Fällen.

Die Sensitivität des Röntgens lag im Vergleich zur CT bei 83,6% (geringere Sensitivität als bei vorangegangenen Studien von Villamonte-Chevalier et al. 2015 und Rau et al. 2011), während die Spezifität 83,5% betrug. Es ergaben sich eine diagnostische Genauigkeit von 83,6% und eine

gute Übereinstimmung der Methoden mit einem Kappa-Wert von 0,67. Diese Werte lagen über denen der vorangegangenen Studien (Villamonte-Chevalier et al. 2015 und Rau et al. 2011).

Die im Röntgen falsch negativen Befunde zeigten eine signifikante ($p = 0,0001$) Korrelation mit dem Vorliegen einer Fissurlinie in der CT. Eine Korrelation mit falsch positiven Befunden konnte nicht festgestellt werden. Das Vorliegen einer Fissurlinie führte weder zu einer deutlichen Veränderung der Hounsfield-Einheiten noch zu einer reduzierten Dichte (nicht signifikant) oder Abgrenzbarkeit (signifikant) des PCM auf den Röntgenbildern. Dies ist eine mögliche Quelle für falsch negative Einstufungen bei der Röntgenbildbeurteilung. In der CT-Untersuchung wiesen Ellenbogen mit Fissur eine signifikant höhere Dichte auf als Ellenbogen mit Fragment. Ellenbogen, die ein Fragment aufwiesen, zeigten eine signifikant reduzierte Hounsfield-Werte (0,0001). Hier steht die vorliegende Studie im Gegensatz zu vorangegangenen Studien (Cook und Cook, 2009).

Eine reduzierte Abgrenzbarkeit der PCM-Spitze war in Röntgen und CT signifikant mit dem IEWG-Grad korreliert. Auch die subjektive Dichte-Beurteilung im Röntgen zeigte eine Korrelation mit der Einteilung in die IEWG-Grade in Röntgen und CT.

Zusätzlich wurden signifikante Korrelationen bei der Auswertung der subjektiven Abgrenzbarkeit und Dichte in den einzelnen Gruppen „ohne Koronoiderkrankung“, „Fissur“ oder „Fragment“ nachgewiesen. Die Abgrenzbarkeit war im Mittel bei Hunden mit fragmentiertem PCM signifikant geringer als bei Hunden mit einer Fissur ($p = 0,03$). Die Dichte war mit $p = 0,08$ bei fragmentiertem PCM signifikant reduziert.

Die Messung der Hounsfield-Einheiten zeigte, dass die Dichte bei Ellenbogen mit Fragment im Vergleich zu gesunden Gelenken signifikant reduziert war ($p = 0,0001$). Beim Vergleich mit Gelenken, die eine Fissur aufwiesen, konnte ebenfalls ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0,0045$). Auch beim Vergleich der Dichtewerte mit der Röntgeneinschätzung der Abgrenzbarkeit und Dichte konnte eine signifikante Korrelation festgestellt werden ($p = 0,0001$, $r = -0,3238$ und $p = 0,0003$, $r = -0,3047$).

In der CT-Untersuchung wiesen Ellenbogen mit Fissur jedoch eine signifikant höhere Dichte auf als Ellenbogen mit Fragment.

Zusammenfassend konnte der Zusammenhang zwischen der unterschiedlichen Röntgen-Morphologie des Ellenbogens, der CT-Morphologie und der Dichtemessung bei Patienten mit Normalbefund, Fissur und Fragment hergestellt werden. Die Ergebnisse bieten eine teilweise Erklärung für falsch positive und falsch negative Befunde im Röntgen.

Limitierende Faktoren sind, dass in der vorliegenden Studie die CT-Beurteilung als Goldstandard eingesetzt wurde. Eine Beurteilung der Knorpeloberfläche (wie z.B. in der Arthroskopie) erfolgte daher nicht. Weiterhin können Gefäßkanäle zur falsch positiven CT-Befunden geführt haben. Ein Vergleich der Befunde aus der CT mit histopathologischen Untersuchungen der Ellenbogengelenke wäre daher wünschenswert. Da in der vorliegenden Studie junge gesunde Hunde untersucht wurden, war dies nicht möglich.

3.2.5 Computertomografische Morphologie des Ellenbogengelenks und Vorkommen der Ellenbogengelenkdysplasie beim Rotfuchs (*Vulpes vulpes*)

Studie 12

Holbein, L.M., **von Pückler, K.H.**, Kramer, M., Failing, K., Kirsch, M. (2020):

Computertomografische Morphologie des Ellbogengelenks und Vorkommen der Ellbogengelenkdysplasie beim Rotfuchs (*Vulpes vulpes*).

Tierärztliche Praxis, Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere; 48: 176–185.

Der Rotfuchs gehört, wie der Haushund, zu den Canidae und teilt daher einige anatomische Merkmale mit dem Haushund. Ein deutlicher Unterschied besteht jedoch in Hinblick auf das geringere Gewicht und die geringere Größe des Rotfuchses. Besonderheiten am Bewegungsapparat des Rotfuchses sind in der Literatur bisher wenig beschrieben worden (El-Bably et al., 2017; Ozkadif et al., 2022).

Die vorliegende Studie beschrieb die computertomografisch darstellbare Morphologie des Ellenbogengelenks beim Rotfuchs und diente dazu, das Auftreten der Ellenbogengelenkdysplasie in einer Fuchs-Population zu untersuchen. Im ersten Teil der Untersuchung wurde eine Beschreibung der Anatomie gegeben. Besondere Berücksichtigung sollten hierbei Befunde wie die Fläche des Processus coronoideus medialis ulnae oder die Dichte der Gelenkfläche finden. Diese beiden Parameter wurden unter anderem mit dem Auftreten einer Ellenbogengelenkdysplasie beim Hund in Verbindung gebracht (Samii et al., 2002; Burton et al., 2010; Karpenstein, 2010; Dickomeit et al., 2011; Klumpp, 2013; Oltersdorf, 2015). Im zweiten Teil der Studie wurden die Befunde mit denen gesunder Haushunde verglichen, um Informationen zur Konformation und zu möglichen Unterschieden in der Entstehung einer Ellenbogengelenksdysplasie zu erlangen.

Im Rahmen der Studie wurden 94 Ellenbogengelenke von 49 verstorbenen Rotfüchsen aus vier unterschiedlichen Regionen in Deutschland untersucht. Die computertomografische Untersuchung wurde vergleichbar zur Untersuchung von Hunden, die an einer Ellenbogengelenkdysplasie erkrankt sind, durchgeführt. Zum Einsatz kam ein 16-Zeilen-Spiral-Computertomograf (Philips Brilliance TM CT 16-Slice, Amsterdam, Niederlande). Um eine möglichst gute Vergleichbarkeit zu erreichen, wurden die Rotfüchse, wie Hunde, in Brustbauchlage mit gestreckten Vordergliedmaßen untersucht. Auch die Untersuchungsparameter mit einer Schichtdicke von 0,7 mm und die eingesetzte Knochenrekonstruktion waren vergleichbar. Die Bildbeurteilung wurde mithilfe der Software „Horos“ (The Horos Project, Horos v 3.3.5) durch eine Anwärtlerin für den Fachtierarzt für Radiologie und andere bildgebende Verfahren in Konsens mit einem Diplomate des College of Veterinary Diagnostic Imaging durchgeführt. Die Kriterien bei der Auswertung bestanden aus dem Festhalten der primären Veränderungen im Sinne einer Koronoiderkrankung (Fissur oder Fragment) sowie der Form und Abgrenzbarkeit des inneren Kronfortsatzes. Zusätzlich wurde das Vor-

liegen von osteophytären Veränderungen nach dem Schema der *International Elbow Working Group* (IEWG) eruiert und es erfolgte eine Bestimmung der Dichte und Fläche des inneren Kronfortsatzes. Diese wurden in transversal orientierten Bildern an der deutlichsten Ausprägung der Fläche bestimmt.

Um einen Vergleich zu klinisch unauffälligen Hunden zu ermöglichen, wurden CT-Untersuchungen von 17 verstorbenen Hunden großer und mittelgroßer Rassen herangezogen, die vorher keine Anzeichen einer Lahmheit gezeigt hatten. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Messwerte erfolgte eine Normalisierung der Werte anhand des Humerusdurchmessers auf Höhe des Gelenkspalts.

Mithilfe der Software BMDP (BMDP Statistical Software, Inc. Statistical Solutions Ltd. Ireland) konnten die Daten ausgewertet werden. Die Vergleiche wurden mittels t-Test geführt, die Messwerte zusätzlich als Punktwolken dargestellt.

Die subjektive Beurteilung der anatomischen Strukturen ergab die erwartete Größendifferenz. Das Olekranon beim Rotfuchs stellte sich abgerundeter dar und am Tuber olecrani bestanden zwei prominente Knochenausziehungen, die beim Haushund flacher ausgeprägt waren. Bei 52 Ellenbogengelenken von Rotfüchsen (55,3%) war ein Sesambein im M. supinator sichtbar.

In Hinblick auf die Koronoiderkrankung konnte bei zwei Füchsen eine Veränderung des inneren Kronfortsatzes festgestellt werden.

Der innere Kronfortsatz war bei allen Rotfüchsen scharf abgrenzbar (67,0%) oder geringgradig unscharf abgrenzbar (33%). Mit 72 von 94 Gelenken (76,6%) überwog die runde Konformation des inneren Kronfortsatzes beim Rotfuchs. Es bestand eine subjektiv deutlich breite (mediolaterale) Ausdehnung des inneren Kronfortsatzes. Die Breite an der Spitze glich der an der Basis.

Bei 76 von 94 Ellenbogengelenken (80,9%) konnten keine Anzeichen einer Arthrose festgestellt werden. Mit einem Anteil von 17 Gelenken (18%) zeigten wenige Tiere eine geringe Arthrose. Lediglich ein Ellenbogengelenk wies mittelgrade osteophytäre Zubildungen (1,1%) auf, die Arthrosen Grad 2 entsprachen.

Die Dichte des inneren Kronfortsatzes zeigte beim Rotfuchs und Haushund vergleichbare Werte. Beim Vergleich der in Bezug auf den Humerusdurchmesser normalisierten Werte zur Fläche des inneren Kronfortsatzes zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Haushunden und Rotfüchsen.

Zusammenfassend wiesen die Ellenbogengelenke der Rotfüchse eine ähnliche Konformation auf wie die Gelenke der Haushunde. Besondere Unterschiede waren vor allem bei der Konformation des Olekranon und in Hinblick auf die absolute Größe der Strukturen feststellbar. Auch trat beim Rotfuchs das Sesambein im M. supinator häufiger auf. Bei zwei Ellenbogengelenken von Füchsen aus unterschiedlichen Regionen in Deutschland wurden pathologische Veränderungen am inneren Kronfortsatz festgestellt, ohne dass Hinweise auf eine traumatische Einwirkung bestanden. Betrachtet auf die Gesamtanzahl der Tiere, ist die Häufigkeit der Veränderungen am inneren Kronfortsatz bei Rotfüchsen mit der Prävalenz der Ellenbogengelenkdysplasie bei kleinen Hunderassen vergleichbar.

Die Beschreibung der Form und Fläche des inneren Kronfortsatzes zeigte keine besonderen Unterschiede zwischen Haushunden und Rotfüchsen. Sowohl beim Hund als auch beim Rotfuchs war die „runde Koronoidform“ am häufigsten zu beobachten. Auch die Dichtewerte waren mit Be-

trachtung vorangegangener Studien (Karpenstein, 2010; Wennemuth, 2017; Holbein, 2020) vergleichbar, wobei in allen Studien keine normierten Dichtewertmessungen stattfanden.

Die geringen morphologischen Unterschiede der Ellenbogengelenke beim Hund und Rotfuchs erklären damit das häufige Auftreten der Ellenbogengelenkdysplasie beim Hund nicht. Lediglich die größere mediolaterale Ausdehnung des inneren Kronfortsatzes kann beim Rotfuchs als deutlicher Unterschied festgehalten werden. Eine günstigere Verteilung der Belastung des Gelenks wäre daher denkbar.

Bei 18% der Rotfuchse konnten in geringem Maß osteophytäre Veränderungen festgestellt werden. Die Zubildungen konnten vorwiegend am Epicondylus medialis humeri und an der Ulna nachgewiesen werden. Ein Drittel der Rotfuchse zeigte eine unscharfe Kontur am inneren Kronfortsatz. Aufgrund der geringen Größe der Gelenke sollten vor allem Partialvolumenartefakte als Ursache in Betracht gezogen werden. Das Auftreten von Koronoidpathologien beim Rotfuchs ist mit hoher Wahrscheinlichkeit mit kleinen Haushunden vergleichbar.

3.2.6 Abschließende Betrachtung

Die Untersuchungen zeigen, dass zur Beurteilung der Ellenbogengelenkdysplasie beim Hund besondere Voraussetzungen gegeben sein müssen. Vor allem bei der Begutachtung des Processus coronoideus medialis ulnae sind Herausforderungen alltäglich. In der Röntgendiagnostik kann es auch bei erfahrenen Untersuchenden durch Überlagerung der anatomischen Strukturen im zweidimensionalen Röntgenbild zu einem geringen Prozentsatz zu falsch positiven und falsch negativen Beurteilungen kommen. In fraglichen Fällen oder bei unklaren Befunden ist daher eine Untersuchung mittels CT anzuraten. In der computertomografischen Untersuchung können jedoch nur verlässliche Befunde erhoben werden, wenn Artefakte vermieden werden. Besonders Partialvolumenartefakte können bei Schichtdicken von mehr als 1 mm auftreten und die Beurteilung beeinflussen. Eine mögliche Alternative zur CT kann die MRT-Untersuchung darstellen. Aus der Anwendung der MRT ergeben sich jedoch keine Vorteile in Hinblick auf die Genauigkeit der Diagnostik.

Nicht nur Haushunde sind von Veränderungen am Processus coronoideus medialis betroffen – ähnliche Veränderungen können auch bei Wildtieren wie dem Rotfuchs beobachtet werden. Durch deutliche Unterschiede in der Gelenkmorphologie ist die klinische Relevanz jedoch fraglich.

3.3 Darstellung von Stammzellen in der Magnetresonanztomografie

Studie 13

Sun, X., Gamal, M., Nold, P., Said, A., Chakraborty, I., Pelaz, B., Schmied, F., **von Pückler, K.**, Figgel, J., Zhaog, Y., Brendel, C., Hassang, M., Parak, W., Feliu Torres, N. (2019):

Tracking stem cells and macrophages with gold and iron oxide nanoparticles – The choice of the best suited particles.

Applied Materials Today; 15, June: 267–279.

DOI: 10.1016/j.apmt.2018.12.006

Studie 14

Kolecka, M.A., Arnhold, S., Schmidt, M., Reich, C., Kramer, M., Failing, K., **von Pückler, K.** (2017):

Behaviour of adipose-derived canine mesenchymal stem cells after superparamagnetic iron oxide nanoparticles labelling for magnetic resonance imaging.

BMC Veterinary Research; 13: 62.

DOI 10.1186/s12917-017-0980-0

Studie 15

Von Pückler, K., John, K., Bokemeyer, J., Kramer, M., Arnhold, S. (2022):

MRI Tracking of Iron Oxide Labeled Canine Mesenchymal Stem Cells in Artificial Stifle Defects.

Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology; Nov; 35(6): 362–369.

DOI: 10.1055/s-0042-1750432.

Einleitung

Der Einsatz mesenchymaler Stammzellen hat nicht nur in der Humanmedizin, sondern auch in der Veterinärmedizin in den letzten Jahrzehnten an Bedeutung gewonnen (Arnhold und Wenisch, 2015; Meyer-Lindenberg und Kilching, 2018). Typische Einsatzgebiete von Stammzellen in der Tiermedizin sind dabei die Behandlung von degenerativen Gelenkerkrankungen, Knochendefekten oder Sehnenläsionen (Liu et al., 2002; Guo et al., 2004; Kazemi et al., 2017). Bei Hunden wurde besonders die Applikation am Hüft- und Ellenbogengelenk untersucht (Jackson et al., 2001; Kim et al., 2019).

Die Therapie von Knorpeldefekten mithilfe von (meist mesenchymalen) Stammzellen scheint vielversprechend, andere Möglichkeiten zur nachhaltigen Rekonstruktion von hyalinem Knorpel existieren bis heute nicht. Aus diesem Grund besteht ein besonderes Forschungsinteresse, das sich in mehreren Untersuchungen widerspiegelt (Liu et al., 2002; Kazemi et al., 2017). Trotz der Fortschritte in diesem Forschungsbereich stellen enchondrale Ossifikationsstörungen oder chronisch degenerative Veränderungen weiterhin eine besondere therapeutische Herausforderung dar (Olsson et al., 1993; Jackson et al., 2001; Thiede et al., 2012). Einige Studien zeigen, dass nach Stammzelltherapie eine annähernde Wiederherstellung der Gelenkfunktion möglich sein kann (Jackson et al., 2001; Liu et al., 2002; Guo et al., 2004; Kim et al., 2019).

Auch am zentralen Nervensystem, besonders in bei neurodegenerativen Veränderungen oder Rückenmarksverletzungen, haben Stammzellen einen wichtigen Beitrag in der Therapie geleistet (Kon et al., 2012; Barthélemy et al., 2020; Brodeel et al., 2021).

Nach wie vor ist die Wirkweise der Stammzellen nicht eindeutig erklärt und neben parakrinen Faktoren kommt der Differenzierung der Stammzellen in unterschiedliche Gewebe und der damit einhergehenden Reparatur von Defekten eine große Bedeutung zu (Brondeel et al., 2021). Es gibt wenige Informationen über die Verteilung und den weiteren Verbleib der Stammzellen nach deren Applikation. Einige Studien gehen davon aus, dass lediglich die parakrinen Faktoren eine wichtige Komponente der Stammzellapplikation darstellen (Huňáková et al., 2020; Brondeel et al., 2021).

Um den Verbleib der Stammzellen und deren Verteilung im Organismus besser beurteilen zu können, ist ein Verfahren notwendig, das die In-vivo-Beobachtung der Stammzellen zulässt. Hierfür werden die Stammzellen (üblicherweise vor der Applikation) mit Markern versehen. Vorangegangene Studien beschreiben die Markierung von Stammzellen mit Eisenoxid-Nanopartikeln. Um eine möglichst effektive Untersuchung der Zellen zu ermöglichen, dürfen die Zelldifferenzierung, Zellviabilität und Zellaktivität nicht von der Markierung beeinflusst werden (Kostura et al., 2004; Kolecka et al., 2017). Unterschiedliche Strategien zur Markierung der Zellen wurden in der Veterinärmedizin diskutiert. Grundlegend lassen sich ionisierende und nichtionisierende Verfahren zur Darstellung differenzieren (Spriet et al., 2015; Kolecka et al., 2017). Eine Möglichkeit zur Markierung der Zellen sind Radionuklide, die mittels Szintigrafie dargestellt werden können. Hier ist nachteilig, dass die Zellen ionisierender Strahlung ausgesetzt werden. Zusätzlich nimmt die Signalstärke aufgrund der in der Regel kurzen Halbwertszeit der Radionuklide schnell ab (Spriet et al., 2015). Ein nicht-ionisierendes Verfahren, das sich alternativ zur Nachverfolgung markierter Zellen eignet ist die MRT. Mit Ihrer Hilfe bietet sich die Möglichkeit, nichtionisierend und nichtinvasiv überlage-

rungsfreie Darstellungen zu erhalten (Kolecka et al., 2017). Zu diesem Zweck müssen die Zellen mit magnetisierteren Substanzen versehen werden. Bei der Stammzellmarkierung mit Eisenoxidpartikeln (SPIO) werden die Partikel mittels Endozytose (meist) ohne Einsatz von Transfektionsagenzien in die Zellen aufgenommen. (Kostura et al., 2004; Küstermann et al., 2008; Jülke et al., 2015).

Neben der schonenden und effektiven Markierung der Zellen kommt auch der spezifischen und möglichst sensitiven Darstellung der markierten Zellen große Bedeutung zu (Kolecka et al., 2017). Diese Eigenschaften könnten in der Zukunft über die Zellmarkierung durch den Einsatz von Nanopartikeln optimiert werden (Wilhelm et al., 2016). Speziell designte Partikel haben die Möglichkeit, an eine „Zielzelle“ spezifisch zu binden und könnten auf diesem Weg sogar therapeutisch wirksame Stoffe an spezifische Zellen „liefern“. Zusätzlich könnten Stammzellen zum Transport der Nanopartikel an die vorgesehene Stelle hilfreich sein, da sie sich in der Regel vermehrt an entzündliches oder neoplastisch verändertes Gewebe anlagern (Mantovani et al., 2017; Zhao et al., 2017).

Nanopartikel können viele Eigenschaften aufweisen. Für unterschiedliche bildgebende Verfahren stehen magnetische, besonders dichte oder absorbierende oder photoakustisch-wirksame Partikel zur Verfügung (Liu et al., 2014; Wegner und Hildebrandt, 2015; Comenge et al., 2016). Die vor Ort akkumulierten Partikel können zusätzlich auch zu photothermischer Therapie eingesetzt werden (Lucky et al., 2015).

Ein optimaler Einsatz der Zellen ist besonders dann möglich, wenn einerseits die Darstellung der Partikel-markierten Zellen optimiert wird und andererseits der Einfluss der Markierung auf die eingesetzten Zellen untersucht wurde (Jin et al., 2010).

Zusammenfassend bietet der Einsatz der Nanopartikel-Markierung die Möglichkeit zur Darstellung mit unterschiedlichen bildgebenden Modalitäten, die Möglichkeit zur verbesserten Diagnose und zur Therapie.

Hierfür müssen maximal mögliche Markierungskonzentrationen erreicht werden, ohne die Zelle zu schädigen (Chithrani et al., 2006; Feliu et al., 2016; Nold et al., 2017).

3.3.1 Markierung von Stammzellen und Makrophagen mit Gold- und Eisennanopartikeln

Studie 13

Sun, X., Gamal, M., Nold, P., Said, A., Chakraborty, I., Pelaz, B., Schmied, F., **von Pückler, K.**, Figiel, J., Zhaog, Y., Brendel, C., Hassang, M., Parak, W., Feliu Torres, N. (2019): Tracking stem cells and macrophages with gold and iron oxide nanoparticles – The choice of the best suited particles. *Applied Materials Today*; 15, June: 267–279.

Das Ziel der hier vorgestellten Studie war die Erarbeitung optimaler Bedingungen für die Markierung von Stammzellen und Makrophagen mithilfe von Gold- und Eisennanopartikeln. Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf die Darstellung der Zellen in der MRT und CT gelegt und gleichzeitig sollte gezeigt werden, dass keine kurzfristigen nachteiligen Effekte auf die Zelle wirken. Hierfür wurde untersucht, welche maximal mögliche Konzentration der Nanopartikel zur Markierung eingesetzt werden kann, ohne die Viabilität und Proliferation der Zellen zu stören.

In der vorliegenden Studie kamen unterschiedlich große Nanopartikel zum Einsatz. Größere Goldnanopartikel enthalten nicht nur eine größere Menge Gold, sondern sind auch in der CT deutlicher kontrastierbar. Je größer die Nanopartikel sind, desto weniger können jedoch in die Zelle aufgenommen werden (Chithrani et al., 2006). Zwar können kleinere Nanopartikel in größerer Zahl in die Zelle aufgenommen werden – gleichzeitig bestehen jedoch Vermutungen, dass die Partikel durch ihre Architektur eine höhere Toxizität aufweisen (Feliu et al., 2016). Aus diesen Beobachtungen ergab sich die Frage, welche Größe von Goldnanopartikeln für die Markierung unterschiedlicher Zellen am besten geeignet ist.

Zur Darstellung mittels MRT wurden in der Vergangenheit häufig Eisenoxid-Nanopartikel (SPIONs) eingesetzt. Bei der Detektion dieser Partikel spielt nicht nur die Menge, sondern auch die Komposition der Partikel eine elementare Rolle für den Kontrast in der Darstellung (Yeh et al., 1993; Felix et al., 2006).

In der vorliegenden Studie wurden sechs unterschiedliche Arten von Goldnanopartikeln mit unterschiedlicher Größe und Komposition mit Iohexol und Bariumsulfat im CT verglichen. Zusätzlich wurden zwei unterschiedliche Arten von SPIONs in unterschiedlicher Größe mit Gadodiamid im MRT verglichen. Als Zellen kamen bei der Markierung drei unterschiedliche Stammzelllinien (von Mensch, Pferd, Hund) und eine Makrophagenlinie (Maus) zum Einsatz. Sowohl die Aufnahme der Nanopartikel als auch deren Exozytose, die Zellviabilität und die Proliferation der Zellen wurden 24 h und bis zu 72 h nach der Markierung in Zellmedium untersucht. Für jede Kombination (Zelle und Markierung) wurde die maximal mögliche Gold- oder Eisenmenge bei der Markierung bestimmt.

Für die Versuche wurden Nanopartikel anhand von etablierten Protokollen hergestellt (Höhn et al., 2017; Xu et al., 2018). Die Zellen wurden mit den Nanopartikeln für 4 h, 24 h und 48 h inkubiert.

Anschließend wurde die erreichte Konzentration von Gold und Eisenoxid mithilfe der Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-Massenspektrometrie; ICP-MS) festgehalten. In allen Fällen zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Aufnahme der Partikel durch die Zellen und der Ursprungskonzentration. Lediglich wenn eine sehr große Menge an großen Nanopartikeln (100 nm sphärische Goldnanopartikel) aufgenommen wurde, bestand der Effekt einer „Sättigung“, der besonders bei Stammzellen von Pferden zu beobachten war. Mit wachsendem Durchmesser enthalten die Nanopartikel mehr elementares Gold (Feliu et al., 2016). Aus diesem Grund wurde auch die Konzentration von elementarem Gold berücksichtigt.

Die Beobachtungen bei der Aufnahme der Nanopartikel waren für alle vier Zelltypen ähnlich. Die größte Menge an Gold wurde über 100 nm große sphärische Goldnanopartikel erreicht, während 25 nm sphärische Goldnanopartikel die geringste Menge an intrazellulärem Gold erzielten. Generell zeigte sich die Aufnahme der stäbchenförmigen Partikel im Vergleich zu den sphärischen Partikeln geringer.

Die größte Sedimentation der Partikel korrelierte gleichzeitig mit der deutlichsten Aufnahme. In zweidimensionalen Zellkulturen wird die Aufnahme der Partikel besonders durch die Konzentration der Partikel an der Oberfläche bestimmt.

Ein weiterer signifikanter Faktor bei der Markierung war die Dauer der Inkubation. Die Kombination aus Inkubationszeit und Partikelkonzentration spielte neben der Partikelgröße eine wichtige Rolle. Wenn alle Konzentrationen und Messzeitpunkte im Vergleich betrachtet wurden, konnte bei humanen Stammzellen eine deutlichere Aufnahme als bei allen anderen Spezies festgestellt werden. Die Aufnahme von Goldpartikeln war bei humanen Stammzellen am deutlichsten zu beobachten, während die Zellen von Pferden die geringste Partikelaufnahme zeigten. Dabei zeigte sich sowohl für das Oberflächenverhältnis der Zellen als auch für die Zellproliferationsrate eine Signifikanz. Es besteht die Annahme, dass eine größere Oberfläche der Zellen zu breiterem Kontakt mit den Nanopartikeln und damit zur Aufnahme einer größeren Menge der Partikel in die Zelle führt. Die Aufnahme der Nanopartikel war bei Makrophagen wesentlich höher als bei Stammzellen.

Bei der Betrachtung der Faktoren innerhalb der Zelle, die die Konzentration der Nanopartikel beeinflussen können, sind besonders die Exozytose der Partikel sowie die Zellteilung zu beachten (Parak et al., 2002; Ebersold, 2018). Während der Zellteilung werden die Partikel in unterschiedlichem Maß an die Tochterzellen weitergegeben (Parak et al., 2002). Dies führt zu einer weiteren Verdünnung der Zellen- besonders dann, wenn eine hohe Teilungsrage vorliegt (Parak et al., 2002). Um diesen Faktoren Rechnung zu tragen, wurden in der vorliegenden Studie sowohl die Zellteilungsrate als auch die Fläche und das Volumen der unterschiedlichen Zellen verglichen. Hierbei konnte beobachtet werden, dass humane Stammzellen die größte Fläche und das größte Volumen boten. Während Hundezellen die zweitgrößten Zellen waren, waren nur die Makrophagen noch kleiner als die Stammzellen von Pferden. Bei den Stammzellen konnte ein Zusammenhang zwischen der Zellfläche bzw. dem Volumen und der Aufnahme der Nanopartikel festgestellt werden. Nachdem eine Normalisierung des Partikelgehalts pro Zelle in Hinblick auf das Volumen stattgefunden hatte, konnte gezeigt werden, dass der Betrag von Partikeln pro Volumeneinheit der Zelle keinen deutlichen Unterschied bei den unterschiedlichen Zelltypen zeigte.

Auch in Hinblick auf die Zellteilung und deren Zusammenhang mit der Reduktion der Partikel pro Zelle konnte keine signifikante Korrelation festgestellt werden. Dennoch konnte bei Zellen mit hoher Proliferationsrate eine schnellere Abnahme des Nanopartikelgehalts beobachtet werden. Auch die parallel stattfindende Exozytose muss berücksichtigt werden (Bartczak et al., 2012; Ohm et al., 2014). Die Exozytose hat sich in der vorliegenden Studie besonders bei kleineren Zellen gezeigt und gleichzeitig führte eine hohe Zellteilungsrate zur einer häufigeren Exozytose.

Große Mengen aufgenommener Marker beeinträchtigen die Zellfunktion. Um die Zellfunktion zu überprüfen, wurden weitere Versuche durchgeführt und die Zellviabilität überprüft (Felix et al., 2015; Nold et al., 2017). Diese zeigte sich lediglich bei den Makrophagen verändert, während die humanen Stammzellen auch nach maximaler Exposition Ihre Morphologie und Viabilität behielten. Da stäbchenförmige Goldpartikel in großen Mengen in die Zellen aufgenommen wurden und zusätzlich unter Einsatz von toxischem Cetyltrimethylammoniumbromid hergestellt wurden, konnte ein deutlicher Einfluss auf die Zellviabilität festgestellt werden.

Besonders die Zellproliferation der humanen Stammzellen und der Makrophagen wurde von der Markierung beeinträchtigt. Eine wichtige Beobachtung ist dabei, dass die Proliferation ein wichtiger Indikator für die Zytotoxizität ist (Ma et al., 2017). Zusammengefasst weisen kleinere Goldpartikel eine höhere Toxizität auf als größere, während größere eine deutlichere Hemmung der Proliferation verursachen.

Um die optimale Markierungsmenge zu erarbeiten, wurde neben der optimalen Markierung auch das optimale Level der Zellteilung bestimmt und die beiden Parameter kombiniert.

Bei sehr hohen Konzentrationen entsteht eine Agglomeration der Partikel. Aus diesem Grund wurde im Versuch bei einigen Zellen die toxische Konzentration nicht erreicht.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass sphärische Goldnanopartikel mit einem Durchmesser von 50 oder 100 nm zur Markierung von Makrophagen und humanen Stammzellen in der Kombination von Markierungseffizienz, Exozytose, Viabilität und Proliferationsrate am besten geeignet sind. Die Goldnanopartikel mit der Größe 100 nm zeigen die größte Menge an intrazellulärem Gold.

Anhand der möglichen Markierungseffizienz konnten für CT und MRT sog. „Kalibrierungskurven“ erstellt werden. Die CT-Dichtewerte in Hounsfield-Einheiten waren mit der Menge an Goldnanopartikeln korreliert und es konnte der Schwächungskoeffizient für Gold eingesetzt werden. Die unterschiedlichen Goldnanopartikel-Konzentrationen wurden zur Erstellung der Kurve in einem Agarose-Gelphantom untersucht. Die Eisenpartikel wurden mithilfe der MRT untersucht. Es bestand eine deutliche Nachweisbarkeit der Intensitätsänderung in T2w-gewichteten Sequenzen bei markierten Zellen. Mithilfe der „Kalibrierungskurven“ kann der Gehalt an Goldpartikeln (in der CT) und der Gehalt an Eisenpartikeln (mithilfe der MRT) als Näherung berechnet werden.

Zusammenfassend konnte die Studie zeigen, dass sowohl Makrophagen als auch unterschiedliche Stammzellen mit Gold- und Eisennanopartikeln markiert werden konnten. Die Markierungseffizienz hing dabei mit der Art der Nanopartikel, der Zellart, der Zelloberfläche und -form sowie der Proliferationsrate und Exozytose zusammen. Größere Partikel konnten die schonendste und effizienteste Markierung erreichen. Damit kommt besonders der Auswahl der Partikelgröße ein besonderer Stellenwert zu.

3.3.2 Markierung caniner mesenchymaler Stammzellen mittels Ultrasmall superparamagnetic iron oxides

Studie 14

Kolecka, M.A., Arnhold, S., Schmidt, M., Reich, C., Kramer, M., Failing, K., **von Pückler, K.** (2017): Behaviour of adipose-derived canine mesenchymal stem cells after superparamagnetic iron oxide nanoparticles labelling for magnetic resonance imaging. BMC Veterinary Research; 13: 62.

Die vorliegende Studie betrachtet den Einfluss der Markierung von ADMs (mesenchymalen Stammzellen aus Fettgewebe) auf deren Viabilität, Differenzierungspotenzial und Proliferation. Zusätzlich sollte geklärt werden, wie lange die Markierung der Zellen persistiert und mittels 1-Tesla-Magnetresonanztomografen dargestellt werden kann. Die Arbeit sollte zur Klärung grundlegender Fragen beitragen, die vor dem Einsatz der Zellen im klinischen Kontext beachtet werden sollten.

Im Rahmen der Studie wurden canine mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe (ADMs) isoliert. Bei der Markierung der Zellen kamen drei unterschiedliche Konzentrationen des kommerziell verfügbaren superparamagnetischen Eisenoxid-Kontrastmittels (SPIO) „Endorem“ zum Einsatz. Die Konzentrationen wurden auf Basis vorangegangener Studien gewählt (Kruttwig et al., 2009). Eine Konzentration von 28,35 µl wurde nach weiterer Evaluation für die weiteren Untersuchungen im Rahmen der Studie eingesetzt. Die ADMs (150.000 Zellen) wurden mit einer Konzentration von 28,35 µl/ml (SPIO = 448 µg/ml; Fe = 319,2 µg/ml) für 24 h zur Markierung inkubiert. Sieben Proben wurden erstellt und an Tag 3 sowie nach 1, 2 und 3 Wochen nach der Markierung einer Berliner-Blau-Färbung unterzogen. Die Zahl der Eiseneinschlüsse in den Zellen wurde zu den o.g. Zeitpunkten evaluiert. Zusätzlich wurde eine magnetische Zellseparation (MACS) genutzt, um die Markierungseffizienz in Prozent zu bestimmen (MiniMACS separator, Miltenyi Biotec).

Eine Phalloidin-Färbung (Phalloidin, Sigma Aldrich) diente zur Darstellung der Actinfilamente 1 Woche nach der Färbung. Zusätzlich zu den Untersuchungen wurde eine Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM) durchgeführt (TEM 109, Zeiss). Diese diente zur genaueren Evaluation der intrazellulären Partikellokalisierung.

Das Differenzierungspotenzial der ADMs wurde in adipogener, osteogener und chondrogener Richtung untersucht. Während markierte und unmarkierte Zellen einem Differenzierungsmedium ausgesetzt wurden, wurde die Negativkontrolle mit Standardmedium inkubiert. Für den Nachweis der adipogenen Differenzierung wurde nach einer Inkubation von 2 Wochen eine Red-Oil-O-Färbung durchgeführt (Merck). Für den Nachweis der osteogenen Differenzierung wurde eine von-Kost-Färbung durchgeführt (Merck). Die chondrogene Differenzierung fand für einen Zeitraum von 4 Wochen mit einem Differenzierungsmedium in Falcon-Röhrchen statt. Zum Nachweis wurde eine Alcan-Blau-Färbung durchgeführt (Sigma Aldrich).

Für die Untersuchung der Zellproliferation wurde ein sog. „MTT“-Test durchgeführt (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid). Eine zusätzliche Darstellung der Migration und Proliferation der Zellen fand mithilfe eines Culture-Insert-Systems (IBIDI) und Life Cell Imaging (Zeiss) statt.

Die Markierung der Zellen wurde mittels 1-Tesla-MRT dargestellt (Gyrosan Intera, Philips Medical Systems). Markierte Zellen der 7 Proben wurden in einem Agarphantom mit 0,5 ml Volumen für jede Woche fixiert. Eine zusätzliche Negativprobe (nur Agar), eine Positivprobe (Endorem mit einer Konzentration von 28,35 µl/ml) und eine Gegenprobe mit positivem Kontrastmittel (Dotarem, Guerbet) dienten als Kontrolle. Das Protokoll enthielt eine horizontal orientierte T2-gewichtete Gradientenecho-Sequenz und eine T2-gewichtete Turbospinecho-Sequenz.

Um die Signalintensität zu quantifizieren wurde mithilfe einer Software die relative Intensität in „Units“ bestimmt (View Forum R6.3V1L7 SP1 2010, Philips Medical System). Hierfür wurde in jeder Probe eine definierte „Region of interest“ (ROI) platziert.

Die statistische Bearbeitung der Daten enthielt eine Varianzanalyse, um den Rückgang der Zellmarkierung in der MACS-Untersuchung abzubilden. Der Einfluss der Markierung auf die Migration der Zellen und den Defektverschluss wurde mithilfe eines t-Tests betrachtet. Um den Einfluss der einzelnen Zelllinie auf die Ergebnisse zu berücksichtigen, wurde eine Pearson-Korrelation durchgeführt. Die Signalintensität in der MRT-Untersuchung in Zusammenhang mit dem Untersuchungszeitpunkt und der MRT-Sequenz wurde mittels Varianzanalyse untersucht (ANOVA). Zusätzlich wurde die Korrelation der MRT-Sequenzen und der Ergebnisse des MACS-Tests an den drei unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten eruiert.

Nach einer erfolgreichen Isolierung der Stammzellen konnte bei einer Endorem-Konzentration von 448 µg/ml eine ausreichende Markierung nach 24 h Inkubation festgestellt werden. Bei der Zellteilung kam es zu einer ungleichmäßigen Verteilung der Partikel innerhalb der Tochterzellen. In der MACS-Untersuchung war ein deutlicher Rückgang der prozentualen Zellmarkierung feststellbar. Ein Einfluss der Partikel auf das Zytoskelett der ADMs konnte nicht festgestellt werden.

In der TEM wurden die Endorem-Partikel in den Zellen und auch außerhalb der Zellen in Vesikeln detektiert. In der Kontrolle nach 1 und 2 Wochen zeigten sich die Zellen vorwiegend im Zytoplasma. In der dritten Woche konnten die Endorem-Partikel vorwiegend in den Lysosomen aufgefunden werden.

Im Rahmen der adipogenen und osteogenen Differenzierung konnte kein Unterschied zwischen markierten und unmarkierten Zellen festgestellt werden. Bei der chondrogenen Differenzierung zeigten markierte Zellen eine geringere Differenzierungstendenz und in der negativen-Kontrollgruppe konnte eine inzidentielle Chondrogenese festgestellt werden.

Im MTT-Test konnte 48 h nach Markierung eine höhere Absorption festgestellt werden als 24 h nach Markierung.

Im Defektverschluss-Versuch konnte kein signifikanter Einfluss der Zellmarkierung auf die Zellmigration und Proliferation festgestellt werden. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich besonders zwischen den unterschiedlichen Zellspendern.

In der MRT konnte das hypointense Signal, das durch das Negativkontrastmittel Endorem ausgelöst wird, bis zu 3 Wochen lang detektiert werden. Die Signalintensität veränderte sich dabei in beiden Sequenzen signifikant ($p = 0,003$).

Bei der Korrelation der Signalintensitäten aus den beiden Sequenzen zeigte sich an allen Messzeitpunkten und über den gesamten Zeitraum eine signifikante positive Korrelation ($p < 0,001$; $r = 0,879$).

Die vorliegende Studie ist eine der ersten Untersuchungen, die die Darstellung markierter Stammzellen in einem klinisch eingesetzten Tomografen und einer Magnetfeldstärke von 1 Tesla untersuchte. In vorangegangenen Studien wurden unterschiedliche Markierungen mit Hochfeldsystemen von 3 und 7 Tesla erforscht (Urdzikova et al., 2006; Sykova et al., 2006; Nohroudi et al., 2008; Kedziorek et al., 2010).

Die in der Studie verwendeten Spezialfärbungen haben sich als valide erwiesen. Mithilfe der Berliner-Blau-Färbung konnte die Aufnahme der Endorem-Partikel qualitativ sichtbar gemacht werden. Die MACS wurde als geeignete quantitative Methode eingesetzt, um zwischen markierten und unmarkierten Zellen zu unterscheiden. Der Anteil markierter Zellen ging innerhalb von 3 Wochen signifikant zurück ($p = 0,0007$). In der Studie zeigte sich eine deutliche Heterogenität der absoluten Messwerte. Dies kann ggf. auf minimale Unterschiede in der Zusammensetzung der eingesetzten Medien zurückzuführen sein, auch wenn standardisierte Protokolle verwendet wurden. Einen großen Anteil an der Heterogenität der Ergebnisse tragen die unterschiedlichen Zelllinien der unterschiedlichen Spender. Besonders beim Defektverschluss war der Einfluss des Zellursprungs signifikant.

Die Beobachtung aus der TEM, dass nach 3 Wochen deutlich mehr Endorem-Partikel in Lysosomen vorhanden waren, spricht dafür, dass Lysosomen am Ausschleusen der Partikel aus der Zelle beteiligt sind. In vorangegangenen Studien wurde beschrieben, dass Ansammlungen von Eisenpartikeln, umgeben von Zellmembranstrukturen, nach der Markierung auffindbar waren (Sykova et al., 2006; Politi et al., 2007; Küstermann et al., 2008). Es gibt keine Berichte von Clustern, die „frei“ im Zytoplasma liegen. Die Verteilung der Eisenpartikel innerhalb der Zellen ist ein besonders wichtiger Faktor in Hinblick auf die Signalentstehung, da es bei großen Clustern von Eisenpartikeln zu einer wesentlich deutlicheren Signalauslöschung und damit leichterem Detektierbarkeit kommt. Je mehr Partikel sich in Clustern befinden, desto deutlicher ist die Signalauslöschung (Shapiro et al., 2005).

In der Phalloidin-Färbung konnte gezeigt werden, dass die Markierung in der hier eingesetzten Konzentration der Partikel keinen Einfluss auf das Zytoskelett nimmt. Einzelne Studien berichten von einem negativen Einfluss der Markierung bei Ratten- und humanen Zellen, wobei Kontrastmittelkonzentrationen von 600 $\mu\text{g/ml}$ Eisenpartikel zum Einsatz kamen (Seonen et al., 2011). Wie in anderen Studien konnten wir in der vorliegenden Studie nachvollziehen, dass, abhängig von der Dosis, die chondrogene Differenzierung der Stammzellen beeinflusst wird (Bulte et al., 2004; Kostura et al., 2004). Andere Arbeitsgruppen berichten über keine besonderen Beeinflussungen der Differenzierung (Arbab et al., 2004). In der vorliegenden Studie zeigte die Negativkontrolle eine spontane chondrogene Differenzierung, die bereits von Bosnakovski und Mitarbeitern (2004) beschrieben wurde. Ebenfalls in Übereinstimmung mit vorangegangenen Untersuchungen an huma-

nen Stammzellen konnte auch in der hier vorgestellten Studie keine Beeinflussung der Zellmigration oder -proliferation durch die Markierung festgestellt werden (Frank et al., 2003; Arbab et al., 2004).

In den eingesetzten T2-gewichteten Gradientenecho- und Turbospinecho-Sequenzen zeigte sich ein Rückgang der Signalauslöschung bzw. Hypointensität im Verlauf der untersuchten 3 Wochen. Nach 3 Wochen konnte weiterhin eine deutliche Hypointensität nachvollzogen werden. Es bestand jedoch zu keinem Zeitpunkt eine Korrelation zu den Ergebnissen aus der MACS-Quantifizierung und der gemessenen Signalintensität. Eine Erklärung für diesen fehlenden Zusammenhang könnte die variable Verteilung der Endorem-Partikel innerhalb der Probe darstellen, da auch bei einer geringen Endorem-Menge eine MACS-Separation stattfindet und wiederum in der MRT größere Mengen an Kontrastmittel, die nicht als Cluster vorliegen, ein geringeres Signal produzieren. In der vorliegenden Studie wurde die Menge der ausgeschleusten Endorem-Partikel im Medium nicht bestimmt – in vorangegangenen Studien konnte dies jedoch beobachtet werden (Küstermann et al., 2008). Die Tatsache, dass Kontrastmittel-Partikel zum einen durch Zellteilung verdünnt und zum anderen aus der Zelle ausgeschleust werden, ist als limitierender Faktor der In-vivo-Markierung zu betrachten.

In der vorliegenden Studie wurde ein Agargel-Phantom in einer Petrischale für das In-vitro-Design gewählt. Die umliegende Luft oder kleine Gaseinschlüsse im Gel können zu Suszeptibilitätsartefakten führen (Küstermann et al., 2008).

Einige Studien zeigen die besondere Empfindlichkeit des T2-gewichteten Gradientenechos für die von Endorem ausgelösten Suszeptibilitätsartefakte auf (Ittrich et al., 2005; Nohroudi et al., 2008). In der T2-gewichteten Turbospinecho-Sequenz werden Artefakte durch einen wiederholten 180°-Refokusierungsimpuls reduziert (Ittrich et al., 2005; Nohroudi et al., 2008). Die Sequenz kam dennoch zum Einsatz, da es sich um eine häufig angewandte klinische Sequenz handelt, die durch eine gute Kontrastauflösung besonders zur detaillierten Darstellung anatomischer Strukturen geeignet ist. Ein Ziel der Untersuchung war es, zu evaluieren, ob der Effekt der Endorem-Partikel deutlich genug ist, um auch in der T2-gewichteten Turbospinecho-Sequenz detektiert zu werden. Zusammenfassend zeigt die Studie, dass eine Endorem-Konzentration von 319,2 µg/ml Eisenpartikeln (448 µg/ml SPIO) in einem Zeitraum von 3 Wochen keinen nachteiligen Effekt auf die ADMs hatte. Die markierten Zellen waren zu jedem Untersuchungszeitpunkt im MRT detektierbar. Die Erkenntnisse aus der Studie sollten in einem In-vivo-Design überprüft werden. Dabei ist die reduzierte chondrogene Differenzierung genauer zu untersuchen und zu berücksichtigen.

3.3.3 Markierte canine mesenchymale Stammzellen im Defektmodell

Studie 15

Von Pückler K., John K., Kramer M., Bokemeyer J., Arnhold S. (2022):

MRI Tracking of Iron Oxide Labelled Canine Mesenchymal Stem Cells in Artificial Stifle Defects. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*; 35: 362–369.

Im Rahmen dieser Ex-vivo-Studie soll die Darstellbarkeit caniner mesenchymaler Stammzellen in artifiziellen Knorpeldefekten an einer komplexen Struktur wie dem caninen Kniegelenk überprüft werden.

Da in vorangegangenen Untersuchungen eine Markierung mit Eisenoxidpartikeln sowohl eine gute Detektierbarkeit als auch eine gute Verträglichkeit gezeigt hat, wurden in der vorliegenden Studie USPIO (Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Particles) (Endorem, Guerbet, Roissy, France) eingesetzt (Kolecka et al. 2017). Die Ergebnisse der Untersuchung können dazu dienen, die Applikation von markierten Zellen in vivo zu etablieren und beispielsweise bei der Behandlung von Osteochondrosedefekten einzusetzen.

In die Studie wurden 20 Hintergliedmaßen von 10 Hunden, die zuvor aufgrund einer nichtorthopädischen Erkrankung euthanasiert wurden, eingeschlossen. Die Einschlusskriterien waren ein Körpergewicht zwischen 20 und 40 kg, unauffällige Röntgenbilder der Kniegelenke, keine Lahmheiten und ein unauffälliger adspektorischer Befund in der Defektpräparation.

Die in der Studie eingesetzten ADMs wurden unter Anwendung eines Standardverfahrens von Hunden (jünger als 2 Jahre) entnommen, isoliert, kultiviert und gelagert. Danach erfolgte eine Unterteilung der Zellen in positive und negative Kontrollen und die Hälfte der ADMs wurde mit 283 µl Eisenoxidpartikeln für 24 h inkubiert (Kolecka et al., 2017). Die Effizienz der Markierung wurde mithilfe einer Berliner-Blau-Färbung untersucht. Die Viabilität der Stammzellen wurde überprüft. Darüber hinaus wurde ein 24-stündiges Life Cell Imaging durchgeführt. Eine Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurde genutzt, um die Lokalisation der Eisenoxidpartikel innerhalb der ADMs zu überprüfen.

Den Kniegelenken wurde ein Code zugeteilt, um eine zufällige Zuordnung der Gelenke zu den unterschiedlichen ADM-Konzentrationen zu ermöglichen. Die Kniegelenke wurden mit einem Standardzugang eröffnet und zentral in der Gelenkfläche des lateralen Condylus wurde ein definierter Defekt mit einem Durchmesser von 5,6 mm angelegt (HSS Emil Lux GmbH u. Co.).

Nach der Markierung wurden die ADMs resuspendiert und unterschiedliche Zellkonzentrationen wurden präpariert. Die Suspension wurde mit 1 ml Collagen-NF in eine Doppelkammerspritze (Amedrix, Esslingen, Germany) gegeben. Nach Füllung mit dem präparierten Gel härtete der Defekt bei der vorgesehenen Temperatur von 34 °C im Wasserbad innerhalb von 5 min aus. Im An-

schluss wurde das Kniegelenk standardmäßig verschlossen und anschließend mit mindestens 500 ml steriler Kochsalzlösung gespült (37 °C).

Die Kniegelenke wurden im MRT mit der Magnetfeldstärke 1 Tesla (Gyrosan Intera Philips Healthcare, the Netherlands) untersucht. Lagerung und Untersuchungsprotokoll entsprachen einer klinischen Untersuchung. Dabei wurde besonders darauf geachtet, dass der Defekt mindestens in zwei der ausgeführten Schichten sichtbar und in einer der Schichten in voller Ausdehnung mittig dargestellt war. Zur Orientierung der Schichtausrichtung diente die Achse der Femurcondylen.

Im Anschluss an die Untersuchung wurden die Auswertungen zweimal durch einen Beobachter durchgeführt. Die Daten waren geblindet. Für die Auswertung kam eine Radiologie-Software (OsiriX 4.1.2, Pixmeo, Geneva, Switzerland) zum Einsatz. In allen Sequenzen wurde die Signalintensität des Defekts bestimmt, wobei eine „Region of interest“ (ROI) zum Einsatz kam. Neben der Ausdehnung der Messung in Quadratmillimeter wurden maximale, minimale und Mittelwerte der Signalintensitäten (ausgedrückt in Einheiten) inklusive der Standardabweichung festgehalten. Fragliche Fälle wurden im Konsens mit einem weiteren Untersucher bearbeitet. Anhand der Messwerte wurden der Mittelwert der Signalintensität, die Standardabweichung der Unterschiede zwischen zwei Serien und Intraklassen-Korrelationskoeffizienten berechnet. Die Lokalisation des Defekts innerhalb des Condylus wurde in sagittalen und dorsalen Sequenzen mit einem Schema festgehalten, bei dem der Condylus in drei unterschiedliche Areale aufgeteilt wurde, um sicherzustellen, dass die Lokalisation des Defekts konsistent war. Im Anschluss an die Messungen wurde eine weitere Messung des Hintergrunds (außerhalb des Patienten) dazu genutzt, die Messung am Kniegelenkdefekt für die Feldinhomogenitäten zu normalisieren (Carré et al., 2020).

Die Beurteilung der Defekte erfolgte in zwei unterschiedlichen Ansätzen: Während in der ersten Messung strikt der Bereich des Defekts in die Messung eingeschlossen wurde, wurde bei einer zweiten Messung eine subjektive Auswahl der Kollagen-Gel-Region eingesetzt. Von dieser Messung wurden dadurch kleine Gaseinschlüsse im Defektbereich ausgeschlossen und ein Einschließen der Knochenbegrenzung des Defekts in die Messung vermieden. Auch diese Messung wurde mit entsprechenden Messungen des „Hintergrunds“ korrigiert. Die statistische Analyse der Daten wurde mittels Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation) durchgeführt. Mithilfe eines Student-t-Tests (Welch) konnte die Korrelation der Signalintensitäten mit der Zellkonzentration überprüft werden. Zusätzlich wurde eine Korrelation nach Pearson durchgeführt, um den Zusammenhang zwischen Signalintensität und Zellkonzentration zu betrachten und zusätzlich mögliche Einflüsse der Markierung auf die Zellproliferation und -viabilität zu errechnen. Dabei wurde ein p-Wert von 0,05 als signifikant erachtet.

Alle Kniegelenke zeigten keine besonderen Befunde vor dem Eingriff und die Applikation des Kollagen-ADMS-Gemisches verlief in allen Fällen erfolgreich.

In der Berliner-Blau-Färbung wurde eine effiziente Markierung der Zellen nachgewiesen und alle ADMs wiesen Eisenpartikel auf. Die Effizienz der Markierung war unterschiedlich und der Eisengehalt der einzelnen Zellen dadurch heterogen. Sowohl Lichtmikroskopie als auch die Darstellung mittels Phalloidin zeigten keine Auffälligkeiten und das Zytoskelett stellte sich in allen Proben unauffällig dar. Im MTT-Test konnte zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen mar-

kierten und unmarkierten Zellen ($p = 0,0034$) festgestellt werden. Es zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Zellpopulationen unterschiedlicher Spender ($p = 0,278$). Die Korrelation nach Pearson zeigte einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Zellpopulation und der Proliferation der Zellen ($r = 0,87$).

In der TEM konnten Eisenoxidpartikel im Zytoplasma und den Organellen aller untersuchten ADMs festgestellt werden. Ein geringer Anteil der Eisenpartikel konnte außerdem in den Lysosomen detektiert werden.

In der MRT-Untersuchung wurden die Defekte in allen Fällen deutlich differenziert. Die Defekte lagen in sagittal orientierten Bildern im Zentrum der Condylusgelenkfläche (mit „2“ bezeichnet). Die Lokalisation der Defekte war annähernd konstant. Die mittlere Defektgröße betrug $0,365$ ($0,084$) cm^2 in transversalen und $0,137$ ($0,027$) cm^2 in sagittalen Sequenzen.

In 11 der 20 Fälle wurden als Hinweis auf Gaseinschlüsse kleine rundliche hypoattenuierende und gut umschriebene Areale mit vollständiger Signalauslöschung im Gel festgestellt. Bei zwei der 20 Defekte wurde eine unvollständige Defektfüllung detektiert. Es zeigte sich in diesen Fällen eine konkave Einziehung der Geloberfläche.

Die niedrigste Konzentration der markierten Zellen wies eine mittlere Intensität von $46,83$ ($31,00$) Einheiten auf, höhere Konzentrationen dagegen eine mittlere Intensität von $67,13$ ($34,02$) und $51,97$ ($22,88$) Einheiten. Die statistische Auswertung konnte keine Korrelation der Mittelwerte mit der Zellkonzentration feststellen. Die zweite, subjektiv durchgeführte Messung zeigte in der Negativkontrolle einen Mittelwert von $83,11$ ($19,13$). Die niedrigste Konzentration der markierten Zellen wies eine Signalintensität von $65,5$ ($20,23$) Einheiten auf, die höheren Konzentrationen dagegen eine mittlere Intensität von $51,44$ ($7,15$) und $39,87$ ($10,85$). Die Signalintensität nahm mit steigender Konzentration der Eisenpartikel signifikant ab ($p = 0,016$).

Die vorliegende Untersuchung hat gezeigt, dass markierte ADMs mittels MRT semiquantitativ in artifizialen chondralen Defekten detektiert werden können. Hierbei erwies sich besonders die subjektive Platzierung der „Region of interest“ (ROI) in T2-gewichteten Sequenzen als verlässlich. Mithilfe des hier angewandten Kadavermodells konnten das Vorgehen bei der Gel-Implantation und die Detektion via MRT standardisiert werden, bevor die klinische Applikation stattfindet. Ziel der vorliegenden Studie war die Vorbereitung einer klinischen Anwendung. Die angewandten Methoden bei der ADMs-Markierung und -Darstellung wurden in vorangegangenen Studien etabliert (Kolecka et al., 2017). Wie in diesen Studien gezeigt (Kolecka et al., 2017) haben USPIO den Vorteil, dass die Markierung der Zellen in der Lichtmikroskopie sichtbar gemacht werden kann, während kleine Nanopartikel lediglich mithilfe der TEM lokalisiert werden können (Sun et al., 2019).

Ein Nachteil der Markierung mit Eisenpartikeln ist die schrittweise Reduktion der Markierung durch Exozytose aus den Zellen (Kolecka et al., 2017). In der hier vorliegenden Studie war es möglich, auch niedrige Konzentrationen von USPIO in den Zellen zu detektieren. Diese Beobachtung kann in Hinblick auf die spätere klinische Applikation hilfreich sein, da eine weitere Reduktion des Signals in einer klinischen Untersuchung möglich ist (Kolecka et al., 2017).

Durch den Einsatz von fünf unterschiedlichen Stammzellpopulationen wurde eine Variable verursacht, die die Daten beeinflusst haben kann. Lediglich eine (homogene) Zellpopulation einzusetzen, würde jedoch die klinischen Gegebenheiten nicht hinreichend abbilden. Der Einfluss der

Stammzellpopulation auf unterschiedliche Parameter zeigte sich größer als der Einfluss der Stammzellmarkierung. Hinweise auf den Einfluss der Markierung könnten daher in einer homogenen Stammzellpopulation einfacher festgestellt werden. Nachteil des Einsatzes der Zellen zur Rekonstruktion von Knorpeldefekten ist die Beobachtung, dass in vorangegangenen Studien die chondrogene Differenzierung besonders durch die Markierung beeinflusst wurde. Dieser Effekt ist jedoch vor allem bei hohen Eisenpartikelkonzentrationen feststellbar (Bulte et al., 2004; Kostbar et al., 2004; Kolecka et al., 2017). Demgegenüber stehen zusätzlich Studien, die keinen besonderen Einfluss der Markierung auf die chondrogene Differenzierung feststellen konnten (Jülke et al., 2015). Da in der vorliegenden Studie eine geringe Konzentration zum Einsatz kam, ist ein signifikanter Einfluss weniger wahrscheinlich.

Die in der Studie genutzten T2-gewichteten Sequenzen wurden in Anlehnung an vorangegangene Studien ausgewählt (Jülke et al., 2015; Kolecka et al., 2017). Diese Sequenzen sind besonders in Hinblick auf die Darstellung von Negativkontrastmitteln gut geeignet, weil sie sehr empfindlich für die lokale Magnetfeldveränderung sind, die durch Negativkontrastmittel ausgelöst wird. Dies kann jedoch, falls weitere Veränderungen im Magnetfeld vorliegen, zu Artefakten und Messfehlern führen. Als Beispiel sind die Gaseinschlüssen in den eingebrachten Gelarealen zu nennen.

In der ersten Messung wurde keine signifikante Korrelation der T2-gewichteten Signalintensität mit der Stammzellkonzentration festgestellt. Daher kann ggf. die zweite Messung, bei der Gaseinschlüsse vermieden werden, für eine klinische Anwendung hilfreich sein. Hier zeigte sich eine signifikante Korrelation der Messwerte mit der Konzentrationsstufe der Markierung. Der Effekt von Gaseinschlüssen wurde in vorangegangenen Studien beschrieben (Jülke et al., 2015; Kolecka et al., 2017). Zusätzlich wurden hohe Standardabweichungen detektiert, was ebenfalls für eine verringerte Verlässlichkeit der gemessenen Werte spricht. Um genauere Aussagen zu den Verlässlichkeiten der gemessenen Werte und der Wiederholbarkeit der Messung treffen zu können, sind weitere Studien mit Untersuchung der Inter- und Intra-observer Werte notwendig.

Auch wenn die Untersuchung der Gelenke inklusive der Positionierung der Kniegelenke innerhalb des Scanners standardisiert durchgeführt wurde, kann ein Einfluss von Magnetfeld-inhomogenitäten und Variabilität nicht ausgeschlossen werden. Die vorliegende Studie beschreibt Scanner-spezifische Signalintensitäten. Um eine allgemeine Anwendbarkeit der Werte zu erreichen, müssen weitere Normalisierungen der Werte durchgeführt werden. Diese Techniken sind im Bereich der Neurologie bereits etabliert und können ggf. auf den Bereich der orthopädischen Bildgebung übertragen werden (Simmons et al., 1994; Shinohara et al., 2014; Carré et al., 2020).

Da die vorgestellte Studie ein Ex-vivo-Design aufweist konnten umgebende Einflüsse und Umwelteinflüsse in der vorliegenden Studie nicht berücksichtigt werden (Yoo et al., 2011; Lu et al., 2013).

Zusammenfassend zeigt die Untersuchung, dass die Markierung der Zellen und das Einbringen mittels Kollagengel effizient waren. Die subjektive Bestimmung der „Region of interest“ ROI (Messung 2) kann in zukünftigen Studien weiter validiert werden. Die Studie bildet die Basis für die klinische Applikation von Stammzellen bei orthopädischen Erkrankungen von Hund und Katze.

3.3.4 Abschließende Betrachtung

Sowohl Makrophagen als auch humane, equine und canine Stammzellen konnten mit Nanopartikeln markiert werden konnten. Die Markierungseffizienz hing dabei mit der Art der Nanopartikel, der Zellbeschaffenheit und der Proliferation bzw. Exozytose zusammen. Daher sollte die Auswahl einer Markierung unter Berücksichtigung der speziesspezifischen Besonderheiten erfolgen. Generell konnte mit größeren Partikeln eine optimale Markierung erzielt werden. Besonders der Nanopartikelgröße kommt ein besonderer Stellenwert zu. In vitro war ein semiquantitativer Nachweis der Nanopartikelmarkierung möglich.

Die Markierung von caninen mesenchymalen Stammzellen mittels USPIO, einem kommerziellen Kontrastmittel, hat sich zellschonend und effizient gezeigt. Die USPIO wurden durch die Zellen mittels Endozytose aufgenommen und konnten vorwiegend in Vesikeln lokalisiert werden. Nachdem die USPIO im Zytoplasma vorlagen, wurden sie mittelfristig über Lysosomen aus der Zelle geschleust. Die Markierungseffizienz verringerte sich durch die ungleichmäßige Aufteilung der USPIO bei der Zellteilung, die Markierung war dennoch über einen Zeitraum von 3 Wochen nachvollziehbar. Zellviabilität und Funktion waren durch die Markierung nicht eingeschränkt. Lediglich die chondrogene Differenzierung zeigte eine mögliche Beeinträchtigung durch die Markierung. Zur Beobachtung der Markierung haben sich Berliner-Blau-Färbung und Transmissionselektronenmikroskopie als praktikabel erwiesen. Die Quantifizierung mittels MACS, Phalloidinfärbung, Defektverschlussmodell und Life Cell Imaging haben wichtige Informationen geliefert.

Die Kombination der markierten Zellen mit einem Kollagengel war technisch möglich und die markierten Zellen in vitro und im Defektmodell als Signalreduktion in T2-gewichteten Sequenzen nachvollziehbar. Nicht nur T2-gewichtetes Gradientenecho, sondern auch T2-gewichtete Turbo-spinchosequenzen konnten eine Signalreduktion darstellen. Keine der Sequenzen war dazu geeignet im Defektmodell eine quantitative Aussage zu treffen. Die Signalintensität war bei markierten Zellen reduziert, es bestand jedoch keine signifikante Korrelation mit der Zellkonzentration oder der USPIO-Konzentration. Auch bei einer subjektiven Methode mit Ausschluss von Artefakten aus den Messungen war eine quantitative Aussage zur Zellkonzentration im Defektmodell nicht möglich.

4 DISKUSSION

Wie viele Felder in der Tiermedizin haben sich auch die bildgebenden Verfahren in den letzten Jahrzehnten rasant weiterentwickelt und wir haben Zugriff auf eine Vielzahl unterschiedlicher Modalitäten (Johnson, 2013). Daraus ergeben sich neue diagnostische Möglichkeiten und Einsatzgebiete. Die vorliegende Arbeit zeigt die diversen Applikationsmöglichkeiten der Verfahren in unterschiedlichen Bereichen, die in der Diagnostik und Therapie am Skelettsystem einen hohen Stellenwert einnehmen bzw. zukünftig einnehmen können.

Übergeordnetes Ziel der Arbeit ist es, eine Grundlage für den Transfer von Forschungsergebnissen in die klinische Anwendung zu schaffen. Die Arbeit soll zeigen, welche Voraussetzungen für die Diagnostik von dysplastischen und degenerativen Veränderungen gegeben sein müssen und beispielhaft rassespezifische Besonderheiten aufzeigen. Die gewonnenen Erkenntnisse sind Ausgangspunkt für eine erfolgreiche Therapie. Im Bereich der Dysplasien und degenerativen Veränderungen ist die Stammzelltherapie ein großer Hoffnungsträger (Arnhold und Wenisch, 2015). Hier sollen Studien an klinischen MRT-Geräten zeigen, dass eine Darstellung der markierten Stammzellen am Patienten möglich ist, welche Voraussetzungen notwendig sind und welche Informationen erlangt werden können, nachdem die Stammzellen implantiert wurden.

Bei den Untersuchungen zum lumbosakralen Übergang beim Deutschen Schäferhund zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang der Rasse mit anatomischen Besonderheiten. Wie in vorangegangenen Studien konnte festgestellt werden, dass Deutsche Schäferhunde häufiger und früher einen höheren Degenerationsgrad der lumbosakralen Bandscheibe aufweisen als Hunde anderer Rassen (Bürger und Lang, 1992; Moore et al., 2001; Seiler et al., 2002). Die vorgestellten Studien zeichnen sich durch die große Anzahl untersuchter Hunde und die Informationen aus der Hochfeld-MRT aus. In der Kombination einer großen Studienpopulation mit der MRT als Goldstandard zur Beurteilung der Bandscheibendegeneration sollten in der vorliegenden Arbeit Vermutungen aus vorangegangenen Studien überprüft werden. Seiler et al. (2002) beschreiben das häufigere Auftreten einer Facettengelenkanisotropie, die auch in unseren Studien bestätigt werden konnte. Auch die relativ große Differenz zwischen den Facettengelenkwinkeln L6–7 und L7–S1 fällt in allen Studien beim Deutschen Schäferhund besonders auf. Trotz der größeren Probandenzahl in unseren Studien konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Facettengelenkkonformation und dem Degenerationsgrad der lumbosakralen Bandscheibe hergestellt werden. Die Untersuchung der Bandscheibendegeneration und morphologischen Veränderungen wurde ergänzt durch die Untersuchungen zur Röntgenmorphologie am lumbosakralen Übergang. Hier ergab sich zusätzlich zur erblichen Komponente von Röntgenkriterien des lumbosakralen Übergangs der Hinweis auf eine abrupte Verengung des Wirbelkanals beim Deutschen Schäferhund auf Höhe des lumbosakralen Übergangs. Durch die Kombination dieser „kongenitalen“ und rassespezifischen Verengung und die signifikant frühere und deutlichere Bandscheibendegeneration könnte es bei Deutschen Schäferhunden zu einer frühen Kompression der Cauda-equina-Fasern kommen. Eine spätere Untersuchung, die das Wirbelkanalvolumen in Hinblick auf eine lumbosakrale Schmerzhaftigkeit untersuchte, konnte diese These jedoch nicht bestätigen (Gamble et al., 2020). Zusätzlich weisen in allen Studien Deutsche Schäferhunde eine signifikant rassespezifische Stufenbil-

dung am lumbosakralen Übergang sowie eine deutlichere Winkelung des lumbosakralen Übergangs auf. Es bestehen deutliche Hinweise auf eine erbliche Komponente dieser Parameter. Während bei chondrodystrophen Hunden mittlerweile Gene bekannt sind, die an der besonderen und frühen Degeneration der Bandscheiben (z.B. beim Dachshund) beteiligt sind, konnten die relevanten Genkombinationen beim Deutschen Schäferhund bisher nicht nachgewiesen werden (Dickinson und Bannasch, 2020).

Die vorliegenden Untersuchungen waren die ersten, die das System zur Graduierung der Bandscheibendegeneration nach Pfirrmann an einer größeren Gruppe von Hunden im Hochfeldsystem eingesetzt haben. Zuvor wurde der Einsatz der Pfirrmann-Graduierung an kleineren Gruppen und in Niederfeld-Systemen publiziert (Bergknut et al., 2011). Bergknut et al. (2011) konnten mit Kappa-Werten von 0,81 und 0,93 hervorragende Übereinstimmungen für inter- und intraobserver Betrachtungen feststellen. Auch die semiquantitative Einschätzung der Signalintensität anhand von T2-gewichteten MRT-Untersuchungen wurde zum ersten Mal in dieser Weise genutzt. Nachfolgende Studien konnten die Pfirrmann-Graduierung weiter nutzen (z.B. Steffen et al., 2017).

In der Studie zum weiteren Verlauf der Bandscheibendegeneration an einer Gruppe von 5 Hunden konnte festgestellt werden, dass alle Hunde eine hochgradige Bandscheibendegeneration im Alter aufwiesen. Es war kein prognostischer Parameter identifizierbar, der eine Vorhersage bei jungen Hunden zulassen würde.

Häufig wird bei der Suche nach den Ursachen für die genannten rassespezifischen Besonderheiten beim Deutschen Schäferhund die besondere züchterische Selektion in Hinblick auf einen vorwiegend gewünschten Phänotyp mit abfallender Kruppe genannt. Humphries und Mitarbeitende (2020) untersuchen diese These und stellen fest, dass sich die Bewegungsmuster und die Körperhaltung Deutscher Schäferhunde signifikant von anderen Rassen unterscheiden. Deutsche Schäferhunde mit abfallendem Rücken (die besonders in der Schönheitszucht anzutreffen sind) erfahren laut Humphries et al. (2020) mehr Lastaufnahme in der Vorderhand als andere. Eine Korrelation mit entsprechenden Bandscheiben- oder Ellenbogenveränderungen oder weiteren Besonderheiten untersucht die Studie jedoch nicht. Eine Studie von Schaub et al. (2021), die sich ebenfalls mit den Bewegungsmustern der Rasse beschäftigt, kann anhand einer kleineren Hundezahl feststellen, dass eine hohe Variation der Bewegungsmuster zwischen den einzelnen Individuen zu erwarten ist. Bewegungsmuster zeigen sich hochindividuell und weitere Studien sind notwendig, um an größeren Studienpopulationen Bewegungsmuster und Bandscheibendegeneration zu korrelieren und genetische Grundlagen für die Bandscheibendegeneration zu eruieren.

Eine weitere Erkrankung des Bewegungsapparats, bei der sowohl eine genetische (rasse-spezifische) Grundlage als auch besondere Degenerationsmechanismen diskutiert werden, ist die Muskulotendinopathie des M. gastrocnemius. Die erste Beschreibung von Befunden aus der MRT bei dieser Erkrankung wurde 2010 von Stahl und Mitarbeitenden gemacht. Bis zu dieser Sammlung von Fällen in der MRT waren in der Veterinärmedizin lediglich einzelne Fallberichte bekannt (Ridge et al., 2005; Ting et al., 2006). Die MRT bietet die Möglichkeit, durch unterschiedliche Signalintensitäten in T2-gewichteten Sequenzen, T1-gewichteten Sequenzen und nach Fettunterdrückung intramuskuläre Veränderungen zu differenzieren. Nachdem die von Stahl et al. (2010) typischen Veränderungen bei einem Labrador Retriever ebenfalls mittels MRT festgestellt werden konnten

(Fiedler et al., 2013), stellte sich die Frage, ob die Erkrankung bei weiteren Hunderassen auftritt, welche (weiteren) Charakteristika in der MRT-Untersuchung festgestellt werden können und ob die Muskulotendinopathie des M. gastrocnemius als mögliche Differenzialdiagnose bei Hunden mit Lahmheit der Hintergliedmaßen, unabhängig von der Rasse, in Betracht gezogen werden sollte. Die wichtigsten Ergebnisse der vorliegenden Studie bestehen darin, dass auch Hunde, die nicht sportlich eingesetzt werden, eine Muskulotendinopathie entwickeln können. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Beobachtungen war eine eindeutige Kontrastmittelanreicherung nicht in allen Fällen feststellbar und daher kein alleiniges Kriterium.

Als klassisches Anzeichen einer Muskulotendinopathie gelten Zubildungen an den Fabellae, in der vorgestellten Untersuchung konnten jedoch in vielen Fällen keine röntgenologischen Veränderungen an der Fabella festgestellt werden. Die MRT kann dabei helfen, die Erkrankung zu diagnostizieren und das Stadium anhand der Signalintensitäten festzustellen. Da die MRT am Kniegelenk erst 1991 von Widmer et al. genauer beschrieben wurde und im Anschluss – vermutlich aufgrund der geringen Verfügbarkeit – mehrere Jahre lediglich Fallberichte zur MRT am Kniegelenk publiziert wurden, ist es denkbar, dass die Erkrankung des M. gastrocnemius in der Vergangenheit unterdiagnostiziert wurde.

Häufig werden bei klinischen und röntgenologischen Hinweisen auf eine Kniegelenkpathologie wie z.B. einen Riss des kranialen Kreuzbandes vor allem Röntgen und Arthroskopie eingesetzt. Dies führt dazu, dass bei ausbleibender Besserung bzw. unverändert bestehender Lahmheit nach chirurgischer Therapie die Frage nach weiteren Veränderungen in der Kniegelenkregion besteht. Aus diesem Grund sollte in einer der vorliegenden Studien geklärt werden, welche Strukturen nach einer Umstellungsosteotomie wie der TPLO in der MRT beurteilt werden können. Hierfür wurde ein Titanimplantat eingesetzt.

David und Mitarbeiter (2012) machten erste Versuche zur Reduktion von Suszeptibilitätsartefakten am Kniegelenk nach operativen Eingriffen an drei Kniegelenken. Es zeigte sich, dass sowohl die Position als auch die Ausleserichtungen und die Bandbreite bei einer Magnetfeldstärke von 1,5 Tesla einen signifikanten Einfluss hatten und dass diese Parameter, abhängig davon, ob eine TTA oder Fadenzügel-Operation durchgeführt wurde, angepasst werden sollten. Taylor-Brown et al. (2014) berichteten, dass eine vorangegangene TTA keinen signifikanten Einfluss auf die Beurteilung der Menisken bei den in der Studie untersuchten sechs Kniegelenken hatten. Da bei höheren Feldstärken deutlichere Suszeptibilitätsartefakte mit größerer Ausdehnung zu erwarten sind, sind im Hochfeldsystem weitere Strategien zur Auswertung der intraartikulären Strukturen notwendig. Aus diesem Grund wurden Sequenzen zur Artefaktreduktion entworfen. Eine dieser Sequenzen, die sog. WARP-Turbospinechosequenz wurde von Simpler und Mitarbeitern eingesetzt (2014). In der Studie konnten sie an 19 Kniegelenken bei einer Magnetfeldstärke von 3 Tesla nach TPLO mit einem Stahlimplantat besonders in sagittal orientierten Sequenzen eine signifikante Artefaktreduktion erreichen. Da Spezialsequenzen nicht immer verfügbar sind, waren wir in unserer Untersuchung daran interessiert, konventionelle Sequenzen zu vergleichen, um die bestmögliche Wahl „im Alltag“ zu ermöglichen. Hierbei wurde ein Titanimplantat zur TPLO verwendet. Zufällig verteilt wurden zwei unterschiedliche Arten der Implantatpositionierung (distal und proximal) angewendet. Es zeigte sich, dass auch konventionelle MRT-Turbospinechosequenzen bei einer Magnetfeldstär-

ke von 1 Tesla dazu geeignet sind, die intra- und periartikulären Strukturen des Kniegelenks darzustellen. Besonders bei distaler Positionierung des Implantats konnten mithilfe einer T2-gewichteten Turbospinechosequenz annähernd alle Strukturen evaluiert werden. Im Gegensatz hierzu verursachten die für das Kniegelenk empfohlenen T2-Gradientenechosequenzen sowie wasserselektive Knorpelsequenzen oder STIR (Short tau inversion recovery; fettunterdrückte Sequenzen) eine große Ausdehnung der Artefakte. In herkömmlichen Sequenzen ist es möglich, neben den intraartikulären Strukturen auch die umliegenden Weichteilgewebe, wie z.B. den M. gastrocnemius zu beurteilen. Lediglich die Darstellung des M. popliteus war in der vorgestellten Studie limitiert. Bei verbleibender Lahmheit nach TPLO ist es mit der vorliegenden Technik möglich, Patienten in Hinblick auf eine Meniskopathie oder Muskulotendinopathie zu untersuchen.

Zusätzlich ist es zukünftig denkbar, z.B. weiterführende Therapien mithilfe der MRT zu begleiten. Die Applikation markierter mesenchymaler Stammzellen in den M. gastrocnemius wurde in vorangegangenen Untersuchungen validiert und könnte so nach einer TPLO angewandt und kontrolliert werden (Brandt, 2021).

Auch in Hinblick auf die eingangs beschriebene frühe Bandscheibendegeneration besteht die Möglichkeit, die Applikation von mesenchymalen Stammzellen und den weiteren Heilungsverlauf in der MRT zu beschreiben (Steffen et al., 2017). In der Studie von Steffen et al. (2017) wurde die intraoperative Applikation von mesenchymalen Stammzellen bei 3 Hunden intradiskal angewendet und der Verlauf im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (3 Hunde) über 12 Monate verfolgt. Zur Graduierung wurde das etablierte Pfirrmann-System angewendet. Es konnten weder negative noch positive Effekte der Stammzellapplikation in der Gruppe von 6 Hunden festgestellt werden (Steffen et al., 2017).

Die vorgestellten Studien zur Untersuchung der Ellenbogengelenkdysplasie haben gezeigt, dass die Röntgenbeurteilung der Ellenbogengelenkdysplasie nur mit besonderem Training erfolgreich sein kann (Rau et al., 2011). Im Gegensatz zum Röntgen bietet die Computertomografie die Möglichkeit, die komplexe Anatomie des Ellenbogengelenks ohne Überlagerung darzustellen und verbessert damit die Detektion von dysplastischen Veränderungen. Aus Kostengründen, Gründen des Strahlenschutzes und wegen des erhöhten Aufwands ist die Computertomografie lediglich als ergänzendes Verfahren bei unklaren Zuchtröntgenfällen oder bei lahmen Patienten im Einsatz (Rau et al., 2011). Da die CT in Hinblick auf die Beurteilung des Gelenkknorpels äußerst limitiert ist, untersuchen Klumpp et al. (2010) in einer der vorgestellten Studien die Wertigkeit der Hochfeld-MRT-Untersuchung im Vergleich zu CT und Arthroskopie. Die Untersuchung der Ellenbogengelenke mit einer Magnetfeldstärke von 1 Tesla brachte in der vorliegenden Untersuchung keine wichtigen weiteren Erkenntnisse und zeigte sich in vielen Fällen gleichwertig bei der Detektion von Koronoidveränderungen. Die wesentlich längere Untersuchungsdauer ist als nachteilig und belastend für den Patienten anzusehen, während die Strahlenbelastung vermieden werden kann (Klumpp et al., 2010).

Bisher wurden keine Mindestanforderungen für die MRT- oder CT-Untersuchung der Ellenbogengelenke fixiert. Einige Publikationen geben Hinweise zur eingesetzten Schichtdicke: In den

1990er-Jahren wurden vor allem Fallberichte (Braden et al., 1994) oder Studien an kleineren Hundegruppen publiziert, die die Befunde der Ellenbogengelenkdysplasie in der CT beschreiben (Keller et al., 1997). Während Braden et al. (1994) eine Schichtdicke von 1,5 mm einsetzten, beschrieben Reichle und Snaps schon 1999 die Untersuchung des Ellenbogengelenks mit 1 mm Schichtdicke und gleichzeitiger Untersuchung beider parallel im Scanner positionierten Gelenke.

In den Folgejahren konnten Hard- und Software weiterentwickelt werden. Studien, die Mehrzeilentomografen einsetzten, nutzten in der Regel Schichtdicken von unter 1 mm, z.B. Gendler et al. (2014) mit 0,8 mm oder Burton et al. (2018) mit 0,6 mm. Submillimeter-Schichtdicken sind jedoch nicht mit allen Tomografen möglich, de Bakker et al. (2014) nutzten z.B. 1,25 mm Schichtdicken.

Um eine generell anwendbare Schichtdicke zu evaluieren, werden in der vorgestellten Studie Schichtdicken von 1, 2 und 3 mm miteinander verglichen (Zweifel et al., 2020).

Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass die Schichtdicke einen signifikanten Einfluss auf die Beurteilung der Ellenbogengelenkdysplasie hat. Besonders bei dezenten Befunden, wie Fissuren oder reinen Chondropathien, ist eine hohe Ortsauflösung notwendig, um die Befunde erkennen zu können. Je geringer die Schichtdicke, desto höher die Auflösung im Bild (Schwarz und Saunders, 2011). Die Studie dient als Nachweis dieses Prinzips am Beispiel der Ellenbogenuntersuchung und bildet die Grundlage der zukünftigen Empfehlungen, vor allem im Bereich der Zuchtuntersuchungen (IEWG, International Elbow Working Group Proceedings, 2017). Weitere Parameter wie die Lagerung, die Bildmatrix und die Rechenalgorithmen werden in weiteren Studien untersucht (IEWG, International Elbow Working Group Proceedings, 2017).

Zusätzliche Beobachtungen zu Voraussetzungen bei der Ellenbogenbeurteilung in der CT wurden außerdem von Tromblee et al. (2007) gemacht. Sie geben eine Empfehlung zur Grauwertdarstellung bei der Betrachtung der Ellenbogenbilder. Weitere Studien beschäftigen sich mit der Detektion der Ellenbogengelenkinkongruenz. Burton et al. publizieren eine möglichst verlässliche Messmethode zur Einschätzung der Inkongruenz (2018).

Problematische Artefakte, abgesehen von Schichtdickenartefakten, wurden von Balleggeer (2016) beschrieben. Hierbei fand die Vermeidung von Aufhärungsartefakten besondere Beachtung.

Nicht nur technische Voraussetzungen spielen eine Rolle bei der Beurteilung der Ellenbogengelenkdysplasie. Auch die Erfahrung der Untersucher und die besonderen individuellen Gegebenheiten der Patienten oder Zuchthunde sind Variablen, die bei der Diagnostik der Ellenbogengelenkdysplasie eine wichtige Rolle spielen. Rau et al. konnten 2011 mit vier Auswertenden an Röntgenbildern von 102 Ellenbogengelenken zeigen, dass der Ausbildungsgrad bei der Detektion der Koronoiderkrankung eine große Rolle spielt. Erfahrene Untersucher weisen bei klinischen Fällen auf Basis der Arthroskopie als Goldstandard eine Sensitivität von 92,4–96,7% auf. In der Diagnostik der Koronoiderkrankung bei Zuchtröntgenfällen bestehen in einzelnen Fällen jedoch besondere Herausforderungen. Eine der vorgestellten Studien untersucht diese herausfordernden Fälle mit dezenten Veränderungen besonders. Sie betrachtet sowohl primäre Kriterien der Ellenbogengelenkdysplasie als auch sekundäre Kriterien (Degeneration) und vergleicht die Ergebnisse aus der Röntgenuntersuchung mit denen aus der Computertomografie.

Da die Patienten in den meisten Fällen zum Zuchtröntgen vorgestellt wurden und keine Lahmheit aufwiesen, konnte als Vergleichsmethode lediglich die Computertomografie zum Einsatz kommen.

Nach einer Studie von Shimizu et al. (2015) zeigte sich, dass die subjektive Beurteilung computer-tomografischer Bilder bei der Ellenbogengelenkdysplasie eine geringe Wiederholbarkeit bei der Einteilung der Koronoidpathologie und der Sklerose hat. Bei der Detektion von Fragmenten wurde jedoch eine gute Übereinstimmung nachgewiesen. Um den Einfluss der subjektiven Beurteilung gering zu halten, wurde in der hier vorgestellten Studie in Hinblick auf die CT-Beurteilung ein Konsens getroffen. Die Sklerose konnte von Shimizu et al. (2015) mithilfe eines Sklerometers genau detektiert werden. In unserer Studie kam eine Messung der Hounsfield-Einheiten in den unterschiedlichen Regionen der Ulnagelenkfläche zum Einsatz.

Moore et al. (2008) zeigten außerdem, dass die Ergebnisse der CT-Untersuchung oft nicht mit denen der Arthroskopie übereinstimmen und die beiden Verfahren daher komplementär eingesetzt werden sollten. Die hier festgestellte Sensitivität bei der Röntgenbefundung liegt im Vergleich zur CT bei 83,6%, während die Spezifität etwa 83,5% beträgt. Es ergibt sich eine diagnostische Genauigkeit von 83,6% und eine gute Übereinstimmung der Methoden mit einem Kappa-Wert von 0,67. Im Vergleich zu der vorangegangenen Studie von Rau et al. (2011) mit einer Sensitivität von 92,4–96,7% zeigt sich eine deutlich reduzierte Sensitivität. Dies kann unter anderem dadurch erklärt werden, dass in der vorliegenden Studie falsch negative Röntgenbefunde besonders mit dem Vorliegen einer Fissur im CT korreliert waren. Die hohe Spezifität (83,5%) ist ein wichtiger Teil des Zuchtscreenings, da vermieden werden soll, dass erkrankte Tiere bzw. Merkmalsträger in die Zucht eingeschlossen werden. Dass die reduzierte Abgrenzbarkeit des inneren Kronfortsatzes im Röntgen und CT mit dem IEWG Grad korreliert war, zeigt, dass die Auswertenden diesen Befund als Kriterium für die Einstufung gewählt haben.

Die Auswertenden schätzten die reduzierte Dichte und geringe Abgrenzbarkeit des PCM als pathologisch ein und diese Einschätzung wurde durch geringere Dichtewertmessungen in der CT bei fragmentiertem PCM bestätigt ($p = 0,08$). Im Vergleich zu unauffälligen CT-Befunden zeigte sich eine hochsignifikante Reduktion der Dichte ($p = 0,0001$). Diese Beobachtung bestätigt sich auch in der nachfolgenden Untersuchung von Humphreys et al. (2022).

Ein weiterer Zugang zur Bestimmung morphologischer Kriterien, die zur Entwicklung einer Ellenbogengelenkdysplasie beitragen können, ist der Vergleich anatomischer Besonderheiten innerhalb der Familie der Hundartigen. Es bestehen nur wenige wissenschaftliche Untersuchungen zur Konformation des Ellenbogengelenks bei wildlebende Canidae im Vergleich zu Haushunden (Figueirido, 2018). Die Publikation von Figueirido (2018) legt nahe, dass nicht nur zwischen Haushunden und wildlebenden Canidae, sondern auch zwischen Hunden unterschiedlicher Rassen Unterschiede in der Gelenkkonformation bestehen, die auf den Einsatz der Hunde und züchterische Selektion zurückzuführen sind. Die intensive züchterische Selektion kann unter anderem zu einer Konformation geführt haben, bei der dysplastische Veränderungen häufiger auftreten. Die vorgestellte Studie betrachtet die Konformation von Fuchsartigen im Vergleich zum Haushund, um signifikante Unterschiede darzustellen. Gleichzeitig soll die Untersuchung dazu dienen, das Auftreten dysplastischer Veränderungen in der Population zu überprüfen. Die Studie beschreibt zum ersten Mal Anzeichen einer Dysplasie des Ellenbogengelenks bei Fuchsartigen. Die Häufigkeit in der untersuchten Gruppe entspricht der bei kleinen Haushunden.

Zusammenfassend hat sich bei klinisch unauffälligen Hunden das Vorliegen von Fissurlinien als besondere Herausforderung in der Röntgenuntersuchung erwiesen. Eine Fissur führte weder zur einer deutlichen Veränderung der Hounsfield-Einheiten in der CT noch zu einer reduzierten Dichte oder Abgrenzbarkeit des inneren Kronfortsatzes auf den Röntgenbildern.

Morphologische Kriterien zur Erfassung von Hunden mit potenziell falsch negativen oder falsch positiven Befunden im Röntgen konnten im Rahmen der vorgestellten Arbeiten nicht erarbeitet werden. Das bedeutet, dass es keine eindeutigen anatomischen Landmarken gibt, die dazu geeignet sind zu entscheiden, ob eine CT-Untersuchung als Ergänzung zum Röntgen durchgeführt werden sollte.

Stellt sich die kraniale Kontur des inneren Kronfortsatzes im Röntgen unscharf oder weniger dicht dar, sollten strenge Kriterien angelegt werden und im Rahmen von Zuchtuntersuchungen ein Zuchtausschluss erwogen werden, da der Einschluss von falsch negativen Befunden in die Hundezucht ansonsten möglich wäre.

Die phänotypische Selektion mithilfe des Röntgens kann genotypische Varianten bei polygenetischen Erbgängen nur eingeschränkt abbilden, besonders wenn es keine Verpflichtung zur Teilnahme an Screeningprogrammen gibt (Stock et al. 2010). Dennoch ist ein Screeningverfahren wichtig und sinnvoll, da dadurch in den letzten Jahrzehnten eine Reduktion der Erkrankung bei einigen Rassen erreicht werden konnte. Dies kann durch den Einsatz der Zuchtwertschätzung zusätzlich verbessert werden (Stock et al. 2010). In fraglichen Fällen kann die CT zum Einsatz kommen. Dies ist jedoch nur dann sinnvoll, wenn auf eine möglichst gute Orts- und Kontrastauflösung und damit eine gute Bildqualität geachtet wird.

Während Teil 1 und 2 der vorliegenden Arbeit besonders die Darstellung morphologischer Besonderheiten am Skelettsystem und deren Zusammenhang mit unterschiedlichen (degenerativen) Erkrankungen untersuchen, beschäftigt sich der 3. Abschnitt der Arbeit mit möglichen Therapieansätzen bei den bisher unheilbaren degenerativen Skeletterkrankungen.

Ein viel diskutierter und vielversprechender Ansatz zur Therapie von Bandscheibenerkrankungen und degenerativen Erkrankungen am Bewegungsapparat stellt die Anwendung von Stammzellen dar. Auch wenn die ersten klinischen Versuche zur Stammzellapplikation an der Bandscheibe (Steffen et al., 2017) oder intraartikulärer Anwendung am Kniegelenk (Muir et al., 2016) in der Tiermedizin nur Daten von kleinen Gruppen erheben, scheint die zukünftige Applikation, besonders bei der Regeneration von Geweben, vielversprechend (Sasaki et al., 2019).

Um die erfolgreiche Applikation und den weiteren Verbleib mesenchymaler Stammzellen in der klinischen Anwendung darzustellen, wurden unterschiedliche Strategien entwickelt (Urdzikova et al., 2006; Sykova et al., 2006; Nohroudi et al., 2008; Kedziorek et al., 2010; Sprieth et al., 2015; Kolecka et al., 2017; Sun et al., 2021). Die direkte Markierung der Stammzellen vor der Applikation kann besonders kurz- und mittelfristige Informationen zur Lokalisation der Zellen bringen. In der Vorbereitung der Anwendung mesenchymaler Stammzellen am Hund sollte in den vorliegenden Studien geklärt werden, ob canine mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe (cADMS) nach Markierung wichtige Eigenschaften, z.B. das Differenzierungspotenzial, die Teilungsfähigkeit und die Viabilität behalten. Zusätzlich ist es elementar, dass die markierten Stammzellen mithilfe bild-

gebender Verfahren in einem klinischen Ansatz effizient und schonend nachgewiesen werden können. Die hier vorgestellten Studien dienen zum einen dem Nachweis der Detektierbarkeit und möglicher Nachweisgrenzen und zum anderen der Untersuchung einer effizienten Markierung sowie erfolgreichen Differenzierung der Stammzellen. Bis auf einen Einfluss auf die chondrogene Differenzierung konnten nach Markierung keine nachteiligen Effekte festgestellt werden.

Die Markierung der Zellen mittels Gold- und Eisennanopartikeln sollte als Alternative zu den bisher kommerziell erhältlichen Partikeln geklärt werden, da Nanopartikel einige vorteilhafte Eigenschaften, z.B. die Möglichkeit zur Verbindung mit spezifischen Markern oder zur Herstellung von kombinierten Markierungen aus unterschiedlichen Stoffen, haben. Im Vergleich unterschiedlicher Stammzelllinien und Makropahgen konnte bei unterschiedlichen Gold- und Eisenpartikeln ein optimales Partikeldesign erarbeitet werden. Zusätzlich stellt die Studie „Kalibrierungskurven“ für die Markierung von Stammzellen von Hunden, Pferden und Menschen zur Verfügung.

Ob die Ergebnisse zur Darstellung der Zellen mittels MRT *in vitro* in die klinische Anwendung übertragen werden können, sollte in einem weiteren Schritt betrachtet werden: Bei der Applikation markierter mesenchymaler Stammzellen in künstliche Knorpeldefekte am Kniegelenk konnten der Einfluss der anatomischen Strukturen auf die Signalbestimmung und die Rolle von Artefakten genauer betrachtet werden. Besonders Gaseinschlüsse sind bei der Darstellung der Stammzellen mit Negativkontrastmitteln als nachteilig anzusehen. Die Kombination der mesenchymalen Stammzellen mit einem Kollagengel hat sich im vorliegenden Kadavermodell als praktikabel erwiesen. Auch im Hinblick auf die chondrogene Differenzierung kann die dreidimensionale Ausrichtung der Stammzellen innerhalb des Gels hilfreich sein. Das Gel sorgt gleichzeitig dafür, dass die Stammzellen zunächst möglichst nah am Defekt liegen, während eine rein intraartikuläre Injektion schnell zur Verteilung der Zellen führen kann (John, 2016).

Eine Untersuchung von Li et al. (2018) an experimentellen Knorpeldefekten im caninen Kniegelenk konnte eine signifikante Knorpelregeneration bei der Applikation von mesenchymalen Stammzellen in Kombination mit Hyaluronsäure erkennen.

Die vorliegenden Studien zeigen, dass unterschiedliche valide Optionen zur Markierung von caninen Stammzellen bestehen. Sie zeigen außerdem, dass die Zelleigenschaften keine signifikante Beeinträchtigung erfahren und die Markierung effizient ist. In Hinblick auf den Einsatz unterschiedlicher Nanopartikel hat sich gezeigt, dass bei gleichbleibender Konzentration bei der Inkubation größere Partikel effektiver von den Zellen akkumuliert werden (Sun et al., 2019). Um die Nachteile der Exozytose des Markers und der relativen verringerten Markierung durch Zellteilung zu reduzieren, werden weitere Forschungsprojekte zu unterschiedlichen Nanopartikeln (Sun et al., 2019), Oberflächenmarkierungen und weiteren bildgebenden Verfahren wie z.B. optischer Bildgebung durchgeführt.

Ein Nachteil der hier vorgestellten exogenen Markierung der Zellen ist die fehlende Information über die Zellviabilität nach der Implantation. Stammzellen, die abgestorben sind, können durch ihre Markierung weiterhin zum Signal beitragen.

Dieser Nachteil und die negativen Auswirkungen der Markierung durch Endozytose oder Oberflächenmarker können umgangen werden, wenn zelleigene Charakteristika zur Bildgebung eingesetzt werden. Ein Beispiel dieses zukünftig vielversprechenden Zugangs wurde von Yuan et al. (2022) publiziert. Die Studie nutzte die vermehrt vorkommende Mannose an der Oberfläche der Stammzellen: Mithilfe einer MRT-Untersuchung, welche die Mannose-gewichtete chemical-exchange-saturation-transfer Darstellung nutzt, konnte eine erhöhte Mannose-Konzentration gezeigt werden. Weitere Untersuchungen zum Einsatz dieser spezifischen Techniken in der Tiermedizin sind notwendig.

5 ZUSAMMENFASSUNG/ SUMMARY

5.1 Zusammenfassung

Seit der Beschreibung der Röntgenstrahlen vor mehr als 125 Jahren hat sich der Einsatz ionisierender und nicht ionisierender Verfahren in der medizinischen Diagnostik rasant weiterentwickelt. Nicht nur in der Human-, sondern auch in der Tiermedizin nehmen bildgebende Verfahren eine wichtige Stellung im Alltag und in der Forschung ein (Johnson, 2013).

Die vorliegende Arbeit soll Beispiele für eine verbesserte Diagnostik und ein verbessertes Verständnis von degenerativen Erkrankungen des Bewegungsapparats aufzeigen.

Ziel der Untersuchungen war es, häufige Erkrankungen am Bewegungsapparat von Kleintieren mithilfe bildgebender Diagnostik zu untersuchen und genauer zu charakterisieren.

Die ersten beiden Abschnitte der Arbeit zeigen Besonderheiten der degenerativen lumbosakralen Stenose, der Muskulotendinopathie, der Hüftgelenkdysplasie, der Arthropathie am Kniegelenk und der Ellenbogengelenkdysplasie beim Hund auf. Dabei wird nicht nur auf rassespezifische, speziesspezifische und individuelle Parameter eingegangen, sondern die unterschiedlichen Verfahren und Techniken werden auch miteinander verglichen.

Auf diesem Weg soll die vorliegende Arbeit dazu beitragen, standardisierte Zugänge zu Untersuchungen zu beschreiben und eventuell bestehende Schwächen eines diagnostischen Mittels besonders im Hinblick auf spezifische Fragestellungen am Bewegungsapparat aufzeigen bzw. die Wahl der zur klinischen Ausgangssituation passenden Untersuchungstechnik erleichtern. Gleichzeitig können Modelle entwickelt werden, die in der humanmedizinischen Forschung am Tier schonend, wenig invasiv und mit hoher Genauigkeit eingesetzt werden können. Beispiele könnten die Stammzelltherapie bei Bandscheibendegenerationen oder (erblichen) Muskelerkrankungen sein.

Bei der Untersuchung der lumbosakralen Bandscheibendegeneration konnten zum ersten Mal anhand einer größeren Studiengruppe (110 Hunde) rassespezifische Besonderheiten beim Deutschen Schäferhund festgestellt werden, die als prädisponierend für eine Bandscheibendegeneration angesehen werden. Bei Deutschen Schäferhunden zeigte die lumbosakrale Bandscheibe bei 4 möglichen Graden (Grad 1–4) einen mittleren Degenerationsgrad von 2,81 während die Hunde anderer Rassen mit einer hohen Signifikanz ($p < 0,001$) einen geringen Mittelwert von 2,48 aufwiesen. Zusätzlich konnte erstmals die Anwendung der Schnittbildverfahren bei der Graduierung der Bandscheibendegeneration im Hochfeld-MRT mit standardisierter Technik an einer größeren Hundepopulation beschrieben werden. Gleichzeitig wurden Methoden wie die Einteilung der Bandscheibendegenerationsgrade überprüft (Seiler et al., 2003). Damit wurde die Basis für weitere Forschung zur Bandscheibendegeneration gelegt.

Eine besondere Herausforderung bei der Beschreibung von morphologischen Rassebesonderheiten stellten die hohe interindividuelle Varianz vieler Kriterien als auch die variablen Einflüsse von

Rasse, Alter, Geschlecht sowie Umwelteinflüsse (z.B. Haltungs- und Nutzungsform) dar. Fest steht, dass frühdegenerative Veränderungen der Bandscheiben rassenabhängig auftreten können und mit einzelnen Punkten der Skelettkonformation korreliert sind. Morphologische Besonderheiten wurden in einer weiteren Studie der vorliegenden Arbeit an 733 Deutschen Schäferhunden im Vergleich zu 334 Hunden anderer Rassen untersucht. Als ein deutliches Merkmal zeigte sich mit Heritabilitäten von 0,31–0,72 die abrupte Verengung des Wirbelkanals auf Höhe des lumbosakralen Übergangs. Ob ein beim jungen Hund gestellter Befund (z.B. eine Bandscheibendegeneration) im späteren Verlauf zu einer klinisch manifesten Erkrankung führen kann und ob ein Screening bei jungen Hunden sinnvoll ist, konnte in den vorliegenden Studien nicht abschließend geklärt werden.

Rassespezifische Besonderheiten des Skelettapparats wurden auch in anderen Zusammenhängen untersucht: So haben die vorliegenden Studien gezeigt, dass Muskulotendinopathien des M. gastrocnemius bei unterschiedlichen Hunderassen auftreten können und nicht, wie zuvor angenommen, auf Hütehunde limitiert sind. Mit konservativer Therapie kehrten 84,6% der Hunde zur ursprünglichen Leistung zurück. Die Reduktion der aktiven Komponente der Erkrankung ließ sich in der Magnetresonanztomografie darstellen.

Bei genauerer Betrachtung der Hüftgelenkkonformation zeigten sich deutliche rassespezifische Unterschiede, die bisher noch nicht bei der Beurteilung der Hüftgelenkdysplasie berücksichtigt wurden. Die Häufigkeit dysplastischer Gelenke betrug in der vorliegenden Studie 11,6% bei Deutsch Drahthaar, 35,8% bei Deutschen Schäferhunden und 44,3% bei Labrador Retrievern. Die Fläche des Femurkopfes und dessen Überdachung waren mit der Rasse, dem Geschlecht und dem FCI-Grad korreliert ($p = 0,011$). Keiner der Messwerte war dazu geeignet, eine Inkongruenz des Hüftgelenks und damit den Grad der Dysplasie zu quantifizieren. Eine Berücksichtigung der Hunderasse und eine Anpassung der Auswertung von Hüftströmgenbildern kann in Zukunft notwendig sein, besonders, wenn die Beurteilung durch künstliche Intelligenz unterstützt werden sollte.

Bei der Beurteilung der Kniegelenke stand der Kreuzbandriss mit begleitenden degenerativen Veränderungen im Fokus der Untersuchungen. Unter besonderen Gegebenheiten war es möglich, auch postoperativ eine eingehende MRT-Beurteilung der Kniegelenke vorzunehmen. In dorsal orientierten Sequenzen zeigten sich signifikante Unterschiede für die Beurteilung des kranialen und kaudalen Horns des lateralen Meniskus ($p = 0,015$) und für den kranialen und kaudalen Anteil des medialen Meniskus ($p < 0,0001$). In T2-gewichteten Turbospinecho-Sequenzen war eine Beurteilung der medialen Kortikalis häufiger möglich (81%) als die der lateralen (73%).

Im Vergleich zu anderen sagittal orientierten Sequenzen konnten in der T2-gewichteten, sagittal orientierten Sequenz große Teile des Gelenkknorpels identifiziert werden (medial 88% und lateral 85%). In Hinblick auf die unterschiedlichen Knorpelstrukturen ergab sich ein signifikanter Effekt der Sequenz in der sagittalen Orientierung ($p < 0,0001$). Die T2-gewichteten Turbospinechosequenzen zeigten zusammenfassend die Möglichkeit zur Beurteilung der meisten Strukturen.

Die Ellenbogengelenkdysplasie des Hundes stellt eine besondere Herausforderung in Hinblick auf die Zuchtselektion und die Diagnostik dar. Die vorgestellten Arbeiten untersuchten Parameter, die

einen Einfluss auf die Genauigkeit der Diagnostik einer Dysplasie haben. Bei der Betrachtung des Röntgens als Screeningverfahren in der züchterischen Selektion der Ellenbogengelenkdysplasie konnte festgestellt werden, dass erfahrene Untersucher eine hohe Sensitivität (96,7%) in der Auswertung der Röntgenbilder erreichen können. Bei der Diagnostik der Koronoiderkrankung zeigte sich die beste Übereinstimmung bei den beiden erfahrenen Auswertenden ($\kappa = 0,74$). Die Wiederholbarkeit der Ergebnisse war ebenfalls bei Erfahrenen sehr gut ($\kappa = 0,73$ und $0,88$) und bei den weniger Erfahrenen niedrig ($\kappa = 0,31-0,42$). Die Zahl falsch positiver und falsch negativer Befunde nahm bei herausfordernden Obergutachtenfällen auch bei erfahrenen Untersuchern zu. Ursächlich waren vor allem das Vorliegen von Fissuren am inneren Kronfortsatz und das Ausbleiben von reaktiven Veränderungen. Es konnte kein rassespezifischer oder morphologischer Befund erhoben werden, der Hinweise auf die Notwendigkeit einer CT-Untersuchung gibt.

Bei der genaueren Untersuchung von CT-Auswertungen konnte festgestellt werden, dass eine CT-Schichtdicke von 1 mm (und weniger) nötig ist, um eine genauere Aussage treffen zu können. Bei einer Schichtdicke von 1 mm war die Detektionsrate von Fragmenten am inneren Kronfortsatz signifikant höher (Untersucher 1 mit 55,4% und Untersucher 2 mit 60,4%). Bei größeren Schichtdicken kam es zu einer signifikanten Unschärfe der Knochenkonturen ($p = 0,0001$).

CT und MRT haben sich in einigen Aspekten als gleichwertig bei der Diagnostik am Ellenbogengelenk erwiesen, dennoch ist die CT der MRT in Hinblick auf den technischen, zeitlichen und finanziellen Aufwand überlegen. Zusätzlich konnten keine eindeutigen morphologischen Kriterien erarbeitet werden, die die Häufigkeit der Ellenbogengelenkdysplasie beim Hund hinreichend erklären. Im Vergleich zum Rotfuchs bestanden beim Hund häufiger Veränderungen im Sinne einer Dysplasie. Eine Korrelation mit der Morphologie der Gelenke war nicht nachweisbar.

Alle genannten Erkrankungen wie z.B. die lumbosakrale Bandscheibendegeneration, die Muskulotendinopathie, Hüft- und Kniegelenkerkrankungen sowie die Ellenbogengelenkdysplasie haben eine grundlegende Gemeinsamkeit: Sie können in der Tiermedizin bisher vor allem symptomatisch therapiert werden. Sobald degenerative Prozesse beginnen, kann mithilfe von konventionellen Methoden keine kurative Therapie erreicht werden. Aus diesem Grund sollte der dritte Abschnitt der Arbeit eine Verbindung zu möglichen zukünftigen Therapien herstellen.

Bildgebende Diagnostik ist nicht nur dazu geeignet, Erkrankungen zu erkennen, sondern kann auch Abläufe während der Heilung und Regeneration nachvollziehbar und damit erforschbar machen. Die vorliegenden Untersuchungen fokussieren die Markierung unterschiedlicher Zellen mit unterschiedlichen Markern und unterschiedlichen Modellen. In Hinblick auf regenerative Prozesse wurde besonders der Einsatz von mesenchymalen Stammzellen untersucht. Unter Einsatz von Nanopartikeln konnten mögliche Darstellungen mithilfe von Tracking-Verfahren aufgezeigt werden, die breitflächig auch im klinischen Kontext zur Verfügung stehen. Ein Ziel der Untersuchungen war es, die Methoden in Hinblick auf ihre klinische Anwendbarkeit zu überprüfen. Ein Transfer der Ergebnisse auf klinische Patienten ist damit möglich. Es konnte festgestellt werden, dass humane Stammzellen die größte Zelloberfläche und das größte Volumen aufweisen, gefolgt von Stammzellen von Hund und Pferd. Makrophagen wiesen die kleinsten Dimensionen auf. Im Rahmen der Studien konnte herausgestellt werden, dass zusätzlich die Art der eingesetzten Partikel einen signifikanten Einfluss auf die markierten Zellen nimmt. Es wurde darüber hinaus gezeigt, dass die

Toxizität des Materials und die Exozytose der Markierung bei einfacher Markierung durch vorangegangene Endozytose die größten Probleme darstellen. So sind größere Goldnanopartikel als besonders zellschonend zu betrachten. Sie waren gut verträglich und zeigten mit 100 nm und 50 nm Durchmesser einen hohen Grad an Sedimentation, der wiederum zu einer erhöhten Aufnahme durch die Zellen geführt hat. Die Untersuchungen leisten einen Beitrag in der Gegenüberstellung unterschiedlicher Zellen und zeigen auf, welche Tiermodelle ggf. für (u.a. humanmedizinische) Fragestellungen geeignet sein können.

Da die Herstellung komplexer Nanopartikel im Moment noch aufwendig und anspruchsvoll ist, kann der Einsatz kommerziell erhältlicher Marker sinnvoll sein. Den Einfluss eines kommerziell erhältlichen Eisenoxidpartikels zeigten die vorletzte und letzte Studie der Arbeit: Demnach wiesen kommerziell erhältliche Eisenoxidpartikel eine gute Markierungseffizienz auf, während der Einfluss auf die Viabilität, Zellteilung und Differenzierung gering war. Limitiert wurde der Partikeleinsatz durch die in den Studien festgestellten Beeinträchtigungen der chondrogenen Differenzierung der Zellen und den Verlust der Markierung durch Exozytose und Zellteilung. Es konnte gezeigt werden, dass die Herkunft der Zellen in Hinblick auf unterschiedliche Spender einen deutlichen und signifikanten Einfluss auf Experimente zur Zellmarkierung hat ($p = 0,278$). Die Besonderheit bestand vor allem im Zusammenhang von Zellspender und Proliferation ($r = 0,87$).

T2-gewichtete Gradientenecho- und Turbospinechosequenzen waren zur Quantifizierung der Markierung einsetzbar. Die Signalintensität war dabei negativ korreliert mit dem intrazellulären Partikelgehalt. Eine Endorem-Konzentration von 319,2 $\mu\text{g/ml}$ Eisenpartikeln (448 $\mu\text{g/ml}$ SPIO) hatte in einem Zeitraum von 3 Wochen keinen nachteiligen Effekt auf die markierten Zellen.

Die Arbeiten konnten deutlich machen, dass Agarose-Gel-Phantome und Kadavermodelle auch bei niedrigeren Feldstärken von 1 Tesla einsetzbar sind. Dabei zeigte sich beim Einsatz von USPIO sowohl in vitro als auch im Defektmodell am Kniegelenk eine deutliche negative Korrelation der Stammzellkonzentration mit der Signalintensität im MRT ($p = 0.016$). Zum ersten Mal wurden „Kalibrierungskurven“ für erwartete Signalintensitäten bereitgestellt. Die Einzelwerte stimmten gut mit vorangegangenen Studien überein. Gold- und Eisenpartikel haben sich als valide erwiesen.

In den vorliegenden Studien konnte zum ersten Mal der Einsatz unterschiedlicher Marker an unterschiedlichen Spezies mit unterschiedlichen bildgebenden Verfahren getestet werden. Als wichtigste Faktoren bei der Markierungseffizienz und Verträglichkeit wurden die Art der Partikel (große sphärische Partikel sind schonend und effizient), Zellart, Zelloberfläche und Zellform, Proliferation, Exozytose und individuelle Einflüsse identifiziert.

Mit dem Wissen aus den Ergebnissen der hier dargestellten Studien ist eine Etablierung der Zellmarkierung für klinische Patienten denkbar.

Zukünftig könnte die Markierung von Zellen mittels Nanopartikeln auf Basis der vorliegenden Studien weiter untersucht werden. Um die Exozytose und Zellteilung als Minderung der Markierung zu umgehen, könnte eine Markierung der Oberflächenantigene und eine Intra-vitam-Markierung bei der Behandlung von degenerativen Bandscheibenveränderungen oder degenerativen Gelenkerkrankungen aufgrund von Dysplasien Erfolg versprechend sein.

5.2 Summary

Since X-rays were discovered over 125 years ago, the use of ionising and non-ionising methods in medical diagnostics has developed rapidly. Imaging procedures play a significant role in everyday clinical practice and research, not only in human medicine but also in veterinary medicine. This study aimed to show examples of improved diagnostics and an increased understanding of degenerative diseases of the musculoskeletal system by examining and characterising common diseases of the musculoskeletal system in small animals using diagnostic imaging. The first two parts of this thesis showed the peculiarities of degenerative lumbosacral stenosis, musculo-tendinopathy, arthropathy of the knee joint, hip joint dysplasia and elbow joint dysplasia in dogs. Breed-specific, species-specific and individual parameters were discussed, and various processes and techniques were compared.

Consequently, this study should contribute to describing standardised approaches for examinations and highlighting possible weaknesses of diagnostic tools, particularly regarding specific questions relating to the musculoskeletal system or to making it easier to choose the appropriate examination technique in correlation with a clinical question.

When examining lumbosacral intervertebral disc degeneration, the breed-specific peculiarities in German shepherd dogs predisposing them to intervertebral disc degeneration could be identified for the first time using a large study population including 110 dogs. German Shepherd dogs showed a mean value of 2.81 for the grade of disc degeneration (out of four grades) while dogs of other breeds showed a significantly lower value ($p < 0.001$) with a mean degeneration of 2.48. The studies included in this thesis were also the first to describe the use of cross-sectional imaging methods using high field MRI with standardised technology in a larger dog population. Simultaneously, methods such as the classification of the degrees of intervertebral disc degeneration were examined. These results represent the basis for further research on intervertebral disc degeneration.

A particular challenge when describing morphological breed characteristics was the high inter-individual variance of many criteria and the variable influences of breed, age, gender and environmental influences, such as the type of husbandry and use. Certainly, early degenerative changes in intervertebral discs are breed specific and can occur correlated with some individual variants of skeletal conformation. Morphological variants were studied in a population of 733 German Shepherd dogs in comparison to 334 dogs of other breeds. A significant difference was observed with regards to the heritability of an abrupt narrowing of the lumbosacral vertebral canal. Whether a finding detected in young dogs, including intervertebral disc degeneration, could lead to a clinically manifest disease and whether screening in young dogs made sense could not be conclusively clarified in the present studies.

The breed-specific peculiarities of the skeletal system could also be examined in other contexts because the studies showed that musculotendinopathies of the gastrocnemius muscle can occur in different dog breeds in contrary to previous reports. After conservative management, 84.6% of the dogs recovered. The regression of the active inflammatory changes can be observed using magnetic resonance imaging.

The examination of the hip joint conformation revealed clear breed-specific differences that have not yet been taken into account for the assessment of canine hip dysplasia. In the present study dysplastic hip joints were identified in 11.6% of German wire-haired pointers, 35.8% of German Shepherd dogs, and 44.3% of Labrador retrievers. The area of the femur head and the coverage of the femur head showed a high correlation in combination with breed, gender, and FCI grade ($p = 0.011$). None of the measurements were suitable for quantifying an incongruity of the hip joint and thus the degree of dysplasia. An individual adjustment of the evaluation of hip x-ray images may be necessary in the future- especially if the assessment should be supported by artificial intelligence.

When assessing the stifle joints, the cruciate ligament rupture with accompanying degenerative changes was the focus of the presented studies. Under certain circumstances, a detailed MRI assessment of the stifle joints was possible after surgery. In dorsally oriented sequences there were significant differences for the assessment of the cranial and caudal horn of the lateral meniscus ($p = 0.015$) and for the cranial and caudal part of the medial meniscus ($p < 0.0001$). In T2-weighted turbo spin echo sequences, the assessment of the medial cortex was possible more frequently (81%) than that of the lateral cortex (73%). Compared to other sagittally oriented sequences, large parts of the articular cartilage could be identified in the T2-weighted, sagittally oriented sequence (medial 88% and lateral 85%). With regard to the different cartilage structures, there was a significant effect of the sequence in the sagittal orientation ($p < 0.0001$). In summary, the T2-weighted turbo spin echo sequences were suitable to assess most structures.

Elbow joint dysplasia in dogs represents a special challenge regarding breeding selection and diagnosis. The studies determined the parameters influencing the accuracy of a dysplasia diagnosis. Examining X-rays as a screening method in the breeding selection of elbow joint dysplasia established that experienced examiners could achieve a high level of sensitivity (96.7%) in evaluating X-ray images. For the diagnosis of medial coronoid disease, the agreement between the two experienced observers was good ($\kappa = 0.74$). The repeatability of the results was also very good for the experienced examiners ($\kappa = 0.73$ and 0.88) and low for those with less experience ($\kappa = 0.31$ – 0.42). The number of false positive and false negative findings increases in challenging expert cases, even among experienced examiners. The main causes are the presence of fissure lines in the area of the medial coronoid process and the absence of reactive changes.

No breed-specific or morphological findings could be described that indicated the need for a CT examination. It was found that a CT slice thickness of 1 mm (or less) was necessary to make a precise statement. Using a slice thickness of 1 mm, the detection rate of fragments on the medial coronary process was significantly higher (examiner 1 with 55.4% and examiner 2 with 60.4%). With larger slice thicknesses, there was a significant blurring of the bone contours ($p = 0.0001$). CTs (Computed tomography) and MRIs (Magnetic resonance imaging) have, in some ways, proven equivalent in assessing the elbow joint. However, CTs are superior to MRIs in terms of technical, time and financial efforts.

Finally, no clear morphological criteria could be identified that adequately explained the frequency of elbow joint dysplasia in dogs. Compared to red foxes, dogs had more frequent changes com-

patible with elbow dysplasia. A correlation of the presence of elbow dysplasia with the morphology of the joints was undetectable.

All of the diseases mentioned, including lumbosacral intervertebral disc degeneration, musculo-tendinopathy, hip and knee joint diseases, and elbow joint dysplasia, have a crucial feature in common: they can be treated primarily symptomatically in veterinary medicine. When degenerative processes begin, curative therapy cannot be achieved using conventional methods.

Thus, the third section of this work established a connection to possible future therapies.

Diagnostic imaging is suitable for detecting diseases and can make healing and regeneration processes comprehensible and therefore researchable. The studies focus on labelling various cells with different markers and models. Regarding regenerative processes, the use of mesenchymal stem cells in particular was investigated. The studies used nanoparticles to show possible representations with the help of tracking methods that are widely available in a clinical context.

One of the investigations' aims was to determine the methods' clinical applicability, thus enabling a transfer of the results to a clinical setting. It was found that human stem cells have the largest cell surface and volume, followed by dog and horse stem cells. Macrophages have the smallest dimensions. The studies contribute to the comparison of different cells types and show which animal models may be suitable for further research (including human medicine). The studies showed that the type of particles used significantly influenced the labelled cells and that the toxicity of the material and the exocytosis of the labels represented the greatest challenges after a simple labelling of the cells by endocytosis. Larger gold nanoparticles are considered to be well tolerated by cells. Gold particles are well tolerated and, with diameters of 100 nm and 50 nm, show a high degree of sedimentation, which in turn led to increased uptake by the cells.

Since the production of complex nanoparticles remains complicated and demanding, the use of commercially available markers should be considered. The penultimate and final study of the work used a commercially available iron oxide particle. Both studies showed that commercially available iron oxide particles show good labelling efficiency, but their influence on viability, cell division and differentiation is low. Limitations to the use of the particles included the impairment of chondrogenic differentiation and the loss of marking through exocytosis and cell division. It was established that the origin of the cells with regard to different donors impacted cell labelling experiments. It was shown that the origin of the cells with regard to different donors has a significant influence on cell labeling experiments ($p = 0.278$). The most important characteristic was the correlation of cell donors and proliferation ($r=0.87$).

T2-weighted gradient echo and turbo spin echo sequences allowed a semiquantitative estimation of the labeling efficiency. The signal intensity was negatively correlated with the intracellular particle content. An Endorem concentration of 319.2 $\mu\text{g/ml}$ iron particles (448 $\mu\text{g/ml}$ SPIO) had no adverse effect on the labeled cells over a period of 3 weeks.

The work showed that agarose gel phantoms and cadaver models could be used at field strengths of one Tesla. In vitro and in artificial stifle defects, there was a clear negative correlation of the stem cell concentration and the MRI signal intensity after labeling with USPIO ($p=0.016$).

For the first time, "calibration curves" for expected signal intensities were provided. The individual values aligned with those of previous studies. Gold and iron particles were shown to be valid.

The studies tested the use of various markers (based on gold, iron, iodine, barium sulphate and gadolinium) with different imaging methods on a range of species for the first time. Significant species-specific findings were obtained as part of the investigations. The type of particle (large spherical particles were well tolerated and efficient), cell type, cell surface and cell shape, proliferation and exocytosis were identified as the most principal factors in labelling efficiency and tolerability.

With the knowledge gained from the studies, cell labelling could be established for clinical patients.

Future studies could further investigate the labelling of cells using nanoparticles, based on the present studies. To avoid exocytosis and cell division reducing labelling, the labelling of surface antigens and intravitam labelling could be promising for treating degenerative intervertebral disc changes or degenerative joint diseases due to dysplasia.

6 LITERATURVERZEICHNIS

6.1. Allgemeine Literatur

Ballegeer EA. Computed Tomography of the Musculoskeletal System. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2016; 46(3): 373420.

Barberini DJ, Aleman M, Aristizabal F, Spriet M, Clark KC, Walker NJ, Galuppo LD, Amorim RM, Woolard KD, Borjesson DL. Safety and tracking of intrathecal allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in healthy and diseased horses. *Stem Cell Res Ther.* 2018; Apr 10;9(1):96.

Bergknut N, Grinwis G, Pickee E, Auriemma E, Lagerstedt AS, Hagman R, Hazewinkel HA, Meij BP. Reliability of macroscopic grading of intervertebral disk degeneration in dogs by use of the Thompson system and comparison with low-field magnetic resonance imaging findings. *Am J Vet Res.* 2011; 72(7): 899–904.

Bergknut N, Auriemma E, Wijsman S, Voorhout G, Hagman R, Lagerstedt AS, Hazewinkel HA, Meij BP. Evaluation of intervertebral disk degeneration in chondrodystrophic and nonchondrodystrophic dogs by use of Pfirrmann grading of images obtained with low-field magnetic resonance imaging. *Am J Vet Res.* 2011; 72(7): 893–898.

Bochmann M, Ludewig E, Krautwald-Junghanns ME, Pees M. Comparison of the image quality of a high-resolution screen-film system and a digital flat panel detector system in avian radiography. *Vet Radiol Ultrasound.* 2011; 52(3): 256–261.

Braden TD, Stickle RL, Dejardin LM, Mostosky UV. The use of computed tomography in fragmented coronoid disease: A case report. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 1994; 7(01): 40–44.

Brandt J. Darstellung von Eisenoxid- und Goldnanopartikeln in der Magnetresonanztomographie an verschiedenen hierfür entwickelten MRT-Sequenzen anhand eines Kadavermodells des Musculus gastrocnemius des Hundes. Dissertation. Gießen 2021

Brown J. Orthopedic imaging: A practical clinical guide. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2022; 52(4): 869–906.

Burton NJ, Meakin L, Hosworth A, Parsons KJ. Reliability of CT measurement of induced radioulnar step in dogs using a circle superimposition technique. *J Small Anim Pract.* 2018; 59(2):92-97. Erratum in: *J Small Anim Pract.* 2018; 59(5): 317.

Bushberg JT, Seibert JA, Leidholdt EM, Boone JM. The essential physics of medical imaging. Lippincott Williams & Wilkins. 2020.

Cook CR. Ultrasound imaging of the musculoskeletal system. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice.* 2016; 46(3): 355–371.

Da Costa RC und Samii VF. Advanced imaging of the spine in small animals. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice.* 2010; 40(5): 765–790.

Damadian R. Tumor detection by nuclear magnetic resonance. *Science.* 1971; 171(3976): 1151–1153.

Damadian R, Zaner K, Hor D, DiMaio T, Minkoff L, Goldsmith M. Nuclear magnetic resonance as a new tool in cancer research: human tumors by NMR. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1973; 222(1): 1048–1076.

Daniel GB und Berry CR (Eds.). (2006). Textbook of veterinary nuclear medicine. American College of Veterinary Radiology.

- Daniel GB und Neelis DA.** Thyroid scintigraphy in veterinary medicine. *Seminars in nuclear medicine.* 2014; 44(1): 24–34.
- D'Anjou MA, Moreau M, Troncy E, MARTEL-PELLETIER J, Abram F, RAYNAULD JP, PELLETIER JP.** Osteophytosis, subchondral bone sclerosis, joint effusion and soft tissue thickening in canine experimental stifle osteoarthritis: comparison between 1.5 T magnetic resonance imaging and computed radiography. *Vet Surg.* 2008; 37(2): 166–177.
- David FH, Grierson J, Lamb CR.** Reducing susceptibility artefacts in magnetic resonance images of the canine stifle following surgery for cranial cruciate ligament deficiency. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2012; 25(06): 488–497.
- De Armond CC, Lewis DD, Kim SE, Biedrzycki AH.** Accuracy of virtual surgical planning and custom three-dimensionally printed osteotomy and reduction guides for acute uni-and biapical correction of antebrachial deformities in dogs. *JAVMA.* 2022; 260(13), 1–9.
- De Bakker E, Gielen I, van Caelenberg A, van Bree H, van Ryssen B.** Computed tomography of canine elbow joints affected by primary and concomitant flexor enthesopathy. *Vet Radiol Ultrasound.* 2014; 55(1): 45–55.
- Del Signore F, De Dominicis S, Mastromatteo G, Simeoni F, Scapolo PA, Tamburro R, Vignoli M.** Sonoelastography of Normal Canine Common Calcaneal Tendon: Preliminary Results. *Vet Comp OrthopTraumatol.* 2020; 34(03): 200–205.
- Dennis R.** Use of magnetic resonance imaging for the investigation of orbital disease in small animals. *J Small Anim Pract.* 2000; 41(4): 145–155.
- Dennis R.** Optimal magnetic resonance imaging of the spine. *Vet Radiol Ultrasound.* 2011; 52: S72–S80.
- De Souza SAS, Alves AFF, Mamprim MJ, Pina DR.** Quality and dose optimization in canine chest radiography using a digital radiography system. *Radiation Physics and Chemistry.* 2022; 195, 110085.
- Dickinson PJ, Bannasch DL.** Current Understanding of the Genetics of Intervertebral Disc Degeneration. *Front Vet Sci.* 2020; 7: 431.
- Di GUGLIELMO L, CITRONI GA, CHIAPPA SI.** Difetti di riempimento in broncografia [Filling defects in bronchography]. *Radiol Med.* 1955; 41(9): 834–848.
- Eder JM und Valenta EI.** Versuche über Photographie mittelst der Röntgen'schen Strahlen von--- und E (duard) Valenta. R. Lechner. 1896.
- Egan P, Murphy S, Jovanovik J, Tucker R, Fitzpatrick N.** Treatment of osteochondrosis dissecans of the canine stifle using synthetic osteochondral resurfacing. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2018; 31(02): 144–152.
- Entani MG, Franini A, Barella G, Saleri R, De Rensis F, Spattini G.** High-Resolution Ultrasonographic Anatomy of the Carpal Tendons of Sporting Border Collies. *Animals.* 2022; 12(16): 2050.
- Epperly E und Whitty JA.** Equine imaging: computed tomography interpretation. *Veterinary Clinics: Equine Practice.* 2020; 36(3): 527–543.
- Fermi E.** Versuch einer Theorie der β -Strahlen. I. *Zeitschrift für Physik.* 1934; 88(3-4): 161–177.
- Fiedler AM, Amort KH, Bokemeyer J, Kramer M.** Muskulotendinopathie des Musculus gastrocnemius bei einem Labrador Retriever. Ein Fallbericht [Musculotendinopathy of the gastrocnemius muscle in a Labrador Retriever. A case report]. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere.* 2013; 41(5): 349–354.

- Figueirido B.** Phenotypic disparity of the elbow joint in domestic dogs and wild carnivores. *Evolution*. 2018; 72(8): 1600–1613.
- Foster MA und Lauterbur PC.** Progress in nmr Zeugmatographic Imaging: Discussion. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B*. 1980; 289(1037): 487.
- Gamble KB, Jones JC, Biddlecome A, Bridges WC.** Qualitative and quantitative computed tomographic characteristics of the lumbosacral spine in German Shepherd military working dogs with versus without lumbosacral pain. *J Vet Behav*. 2020; 38: 38–55.
- Gavin PR und Bagley RS (Eds.).** Practical small animal MRI. John Wiley & Sons. 2011.
- Gendler A, Keuler NS, Schaefer SL.** Computed tomographic arthrography of the normal canine elbow. *Vet Radiol Ultrasound*. 2015; 56(2): 144–52.
- Ginja MM, Ferreira AJ, Jesus SS, Melo-Pinto P, Bulas-Cruz J, Orden MA, San-Roman F, Llorens-Pena MP, Gonzalo-Orden JM.** Comparison of clinical, radiographic, computed tomographic, and magnetic resonance imaging methods for early prediction of canine hip laxity and dysplasia. *Vet Radiol Ultrasound*. 2009; 50(2): 135–43.
- Carmen J. Giunta CJ und Mainz V.** Discovery of Nuclear Magnetic Resonance: Rabi, Purcell, and Bloch. *Pioneers of Magnetic Resonance*. 2020; 1: 3–20.
- Glover GH.** Overview of functional magnetic resonance imaging. *Neurosurg Clin N Am*. 2011; 22(2): 133–139.
- Greco A, Meomartino L, Gnudi G, Brunetti A, Di Giancamillo M.** Imaging techniques in veterinary medicine. Part II: Computed tomography, magnetic resonance imaging, nuclear medicine. *European Journal of Radiology Open*. 2023; 10: 100467.
- Hang D, Li F, Che W, Wu X, Wan Y, Wang J, Zheng Y.** One-Stage Positron Emission Tomography and Magnetic Resonance Imaging to Assess Mesenchymal Stem Cell Survival in a Canine Model of Intervertebral Disc Degeneration. *Stem Cells Dev*. 2017;26(18): 1334–1343.
- Hare WC.** Radiographic anatomy of the canine pectoral limb. I. Fully developed limb. *J Am Vet Med Assoc*. 1959; 135: 264–71.
- Hayashi N, Watanabe Y, Masumoto T, Mori H, Aoki S, Ohtomo K, Takahashi T.** Utilization of low-field MR scanners. *Magnetic resonance in medical sciences*. 2004; 3(1): 27–38.
- Hebel M, Panek WK, Ruszkowski JJ, Nabzdyk M, Niedzielski D, Pituch KC, Pomorska-Mól M.** Computed tomography findings in a cohort of 169 dogs with elbow dysplasia-a retrospective study. *BMC Veterinary Research*. 2021; 17(1): 1–12.
- Henkels P.** Lehrbuch der veterinärmedizinischen Röntgenkunde: Für Tierärzte und Studierende der Veterinärmedizin. Parey, Berlin 1926.
- Hevesy G.** The Tracer Principle. *Biochem J*. 1923; 17: 439.
- Hoskinson JJ und Tucker RL.** Diagnostic imaging of lameness in small animals. *Veterinary Clin North Small Anim Pract*. 2001; 31(1): 165–180.
- Humphries A, Shaheen AF, Gómez Álvarez CB.** Biomechanical comparison of standing posture and during trot between German shepherd and Labrador retriever dogs. *PLoS One*. 2020; 15(10): e0239832.
- Humphreys WJ, Wilder K, Pettitt R, Comerford EJ, Maddox TW.** CT attenuation of the medial coronoid process is reduced in dogs with medial coronoid disease but independent of arthroscopic disease severity. *Am J Vet Res*. 2022; 83(9):ajvr.21.10.0171.

- John K.** Magnetresonanztomographischer semiquantitativer Nachweis von Kontrastmittelmarkierten mesenchymalen Stammzellen in chondralen Defekten am Kniegelenk des Hundes. Dissertation Gießen. 2016.
- Johnson V.** Diagnostic imaging: reflecting on the past and looking to the future. *The Vet Record.* 2013; 172(21): 546–551.
- Kalender WA.** Computed tomography: fundamentals, system technology, image quality, applications. John Wiley & Sons. 2011.
- Kärkkäinen M, Punto LU, Tulamo RM.** Magnetic resonance imaging of canine degenerative lumbar spine diseases. *Vet Radiol Ultrasound.* 1993; 34(6): 399–404.
- Keller GG, Kreeger JM, Mann FA, Lattimer JC.** Correlation of radiographic, necropsy and histologic findings in 8 dogs with elbow dysplasia. *Vet Radiol Ultrasound.* 1997; 38(4): 272–276.
- King R.** Advanced imaging of the forelimb: Use of musculoskeletal ultrasound and MRI of the shoulder and brachial plexus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2021; 51(2): 383–399.
- Konar M und Lang J.** Pros and cons of low-field magnetic resonance imaging in veterinary practice. *Vet Radiol Ultrasound.* 2011; 52: S5–S14.
- Kraft SL, Gavin PR, DeHaan C, Moore M, Wendling LR, Leathers CW.** Retrospective review of 50 canine intracranial tumors evaluated by magnetic resonance imaging. *J Vet Intern Med.* 1997; 11(4): 218–225.
- Kramer M, Gerwing M, Hach V, Schimke E.** Sonography of the musculoskeletal system in dogs and cats. *Vet Radiol Ultrasound.* 1997; 38(2): 139–149.
- Kremkau FW.** Sonography principles and instruments E-Book. Elsevier Health Sciences. 2019
- Krzemiński M, Lass P, Teodorczyk J, Krajka J.** Veterinary nuclear medicine. *Nucl Med Rev Cent East Eur.* 2004; 7(2): 177–182.
- Lamb CR, Stowater JL, Pipers FS.** The first twenty-one years of veterinary diagnostic ultrasound: a bibliography. *Vet Radiol Ultrasound.* 1998; 29(1): 37–45.
- LeBlanc AK und Peremans K.** PET and SPECT imaging in veterinary medicine. *Semin Nucl Med.* 2014; 44(1): 47–56.
- LeBlanc AK, Jakoby BW, Townsend DW, Daniel GB.** 18FDG-PET imaging in canine lymphoma and cutaneous mast cell tumor. *Vet Radiol Ultrasound.* 2009; 50(2): 215–223.
- LeBlanc AK und Daniel GB.** Advanced imaging for veterinary cancer patients. *Vet Clin North Am: Small Anim Pract.* 2007; 37(6): 1059–1077.
- Lawrence J, Rohren E, Provenzale J.** PET/CT today and tomorrow in veterinary cancer diagnosis and monitoring: fundamentals, early results and future perspectives. *Vet Comp Oncol.* 2010; 8(3): 163–187.
- Lawrence EO und Livingston MS.** The production of high speed protons without the use of high voltages. *Physical Review.* 1931; 38(4): 834.
- Li L, Duan X, Fan Z, Chen L, Xing F, Xu Z, Chen Q, Xiang Z.** Mesenchymal stem cells in combination with hyaluronic acid for articular cartilage defects. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 9900.
- Ljunggren G.** Legg-Perthes Disease in the Dog: A Case Report with Special Reference to Initial Radiographic Changes. *Clinical Orthopaedics and Related Research®.* 1969; 62: 31–36.
- Meomartino L, Greco A, Di Giancamillo M, Brunetti A, Gnudi G.** Imaging techniques in Veterinary Medicine. Part I: Radiography and Ultrasonography. *European Journal of Radiology Open.* 2021; 8:100382.

- Marincek B und Young SW.** Computed tomography of spontaneous canine neoplasms. *Vet Radiol Ultrasound.* 1980; 21(4): 181–184.
- McLarty E, Spriet M, Beylin D, Chou PY, Filliquist B, Marcellin-Little DJ, Kapatkin AS.** Comparison of ¹⁸F-sodium fluoride positron emission tomography and CT: An exploratory study in 12 dogs with elbow pain. *Vet Radiol Ultrasound.* 2021; 62(4): 498–506.
- Martig S, Konar M, Schmökel HG, Rytz U, Spreng D, Scheidegger J, Lang J.** Low-field MRI and arthroscopy of meniscal lesions in ten dogs with experimentally induced cranial cruciate ligament insufficiency. *Vet Radiol Ultrasound.* 2006; 47(6): 515–522.
- Matsui A, Shimizu M, Beale B, Takahashi F, Yamaguchi S.** Assessment of T2 relaxation times for normal canine knee articular cartilage by T2 mapping using 1.5-T magnetic resonance imaging. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2017; 30(06): 391–397.
- Muir P, Hans EC, Racette M, Volstad N, Sample SJ, Heaton C, Holzman G, Schaefer SL, Bloom DD, Bleedorn JA, Hao Z, Amene E, Suresh M, Hematti P.** Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells modulate molecular markers of inflammation in dogs with cruciate ligament rupture. *PLoS One.* 2016; 11(8): e0159095.
- Myers WG und Wagner Jr HN.** Nuclear medicine: How it began. *Hospital Practice.* 1974; 9(3): 103–113.
- Nolte-Ernsting CCA, Adam G, Bühne M, Prescher A, Günther, RW.** MRI of degenerative bone marrow lesions in experimental osteoarthritis of canine knee joints. *Skeletal radiology.* 1996; 25: 413–420.
- Ohlerth S und Scharf G.** Computed tomography in small animals–Basic principles and state of the art applications. *Vet Journal.* 2007;173(2): 254–271.
- Olby NJ, Müntana KR, Sharp NJ, Thrall DE.** The computed tomographic appearance of acute thoracolumbar intervertebral disc herniations in dogs. *Vet Radiol Ultrasound.* 2000; 41(5): 396–402.
- O'Neill DG, James H, Brodbelt DC, Church DB, Pegram C.** Prevalence of commonly diagnosed disorders in UK dogs under primary veterinary care: results and applications. *BMC Vet Res.* 2021; 17;17(1): 1–14.
- Piccione AP, Serrani D, Busoni V, Salvaggio A, Bonazzi M, Bergamino C, Volta, A.** Sonoelastographic features of the patellar ligament in clinically normal dogs. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2018; 31(04): 279–284.
- Pooley RA.** Fundamental physics of MR imaging. *Radiographics.* 2005; 25(4): 1087–1099.
- Quiney LE, Ireland JL, Dyson SJ.** Evaluation of the diagnostic accuracy of skeletal scintigraphy in lame and poorly performing sports horses. *Vet Radiol Ultrasound.* 2018; 59(4): 477–489.
- Reichle JK, Park RD, Bahr AM.** Computed tomographic findings of dogs with cubital joint lameness. *Vet Radiol Ultrasound.* 2000; 41(2): 125–130.
- Rabi II.** Space quantization in a gyrating magnetic field. *Physical Review.* 1937; 51(8): 652.
- Ridge PA, Owen MR.** Unusual presentation of avulsion of the lateral head of the gastrocnemius muscle in a dog. *J Small Anim Pract.* 2005; 46(4): 196–198.
- Riser WH.** JUVENILE OSTEOPOROSIS (osteogenesis imperfecta)* In the dog and cat. *Vet Radiol Ultrasound.* 1962; 3(1): 50–55.
- Röntgen WC.** On a new kind of rays. *Science.* 1896; 3(59): 227–231.
- Röntgen WK.** A new form of radiation. *Science.* 1896; 3(72): 726–729.

- Ruoff CM, Eichelberger BM, Pool RR, Griffin JF, Cummings KJ, Pozzi A, Saunders WB.** The use of small field-of-view 3 Tesla magnetic resonance imaging for identification of articular cartilage defects in the canine stifle: an ex vivo cadaveric study. *Vet Radiol Ultrasound.* 2016; 57(6): 601–610.
- Sasaki A, Mizuno M, Mochizuki M, Sekiya I.** Mesenchymal stem cells for cartilage regeneration in dogs. *World J Stem Cells.* 2019; 11(5): 254–269.
- Schaub KI, Kelleners N, Schmidt MJ, Eley N, Fischer MS.** Three-dimensional kinematics of the pelvis and caudal lumbar spine in German Shepherd dogs. *Front Vet Sci.* 2021; 8: 709966.
- Schnelle GB.** The History of Veterinary Radiology 1. *Vet Radiol Ultrasound.* 1968; 9(1): 5–10.
- Schnell GB.** Some new disease in dogs. *Am. Kennel Gaz.* 1935; 52: 25–26.
- Schwarz T und Saunders J. (Eds.).** Veterinary computed tomography. John Wiley & Sons. 2011.
- Segre E und Seaborg GT.** Discovery of technetium. *Phys Rev.* 1938; 54: 772.
- Seiler SM, Baumgartner C, Hirschberger J, Beer AJ, Brühshwein A, Kreutzmann N, Laberke S, Wergin MC, Meyer-Lindenberg A, Brandl J, von Thaden AK, Farrell E, Schwaiger M.** Comparative oncology: Evaluation of 2-Deoxy-2-[18F]fluoro-D-glucose (FDG) Positron Emission Tomography/Computed Tomography (PET/CT) for the staging of dogs with malignant tumors. *PLoS One.* 2015; 10(6): e0127800.
- Sharp NJ, Cofone M, Robertson ID, De Carlo A, Smith GK, Thrall DE.** Computed tomography in the evaluation of caudal cervical spondylomyelopathy of the Doberman Pinscher. *Vet Radiol Ultrasound.* 1995; 36(2): 100–108.
- Shimizu N, Warren-Smith CM, Langley-Hobbs SJ, Burton NJ, Kulendra E, Bradley K, Bowen E, Holdsworth A, Parsons KJ.** Inter- and intraobserver agreement in interpretation of CT features of medial coronoid process disease. *J Small Anim Pract.* 2015; 56(12): 707–713.
- Simpler RE, Kerwin SC, Eichelberger BM, Wall CR, Thompson JA, Padua A, Purdy D, Griffin JF.** Evaluation of the WARP-turbo spin echo sequence for 3 Tesla magnetic resonance imaging of stifle joints in dogs with stainless steel tibial plateau leveling osteotomy implants. *Vet Radiol Ultrasound.* 2014; 55(4): 414–419.
- Spriet M, Buerchler S, Trela JM, Hembrooke TA, Padgett KA, Rick MC, Vidal MA, Galuppo LD.** Scintigraphic tracking of mesenchymal stem cells after intravenous regional limb perfusion and subcutaneous administration in the standing horse. *Vet Surg.* 2015; 44(3): 273–280.
- Spriet M, Willcox JL, Culp WTN.** Role of Positron Emission Tomography in imaging of non-neurologic disorders of the head, neck, and teeth in veterinary medicine. *Front Vet Sci.* 2019; 6: 180.
- Stahl C, Wacker C, Weber U, Forterre F, Hecht P, Lang J, Gorgas D.** MRI features of gastrocnemius musculotendinopathy in herding dogs. *Vet Radiol Ultrasound.* 2010; 51(4): 380–385.
- Steffen F, Smolders LA, Roentgen AM, Bertolo A, Stoyanov J.** Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells as autologous therapy in dogs with naturally occurring intervertebral disc disease: feasibility, safety, and preliminary results. *Tissue Eng Part C Methods.* 2017; 23(11): 643–651.
- Stock KF, Distl O.** Simulation study on the effects of excluding offspring information for genetic evaluation versus using genomic markers for selection in dog breeding. *J Anim Breed Genet.* 2010; 127(1): 42–52.
- Sun X, Gamal M, Nold P, Said A, Chakraborty I, Pelaz B, Schmied F, von Pückler K, Figiel J, Zhao Y, Brendel C, Hassan M, Park W, Feliu, N.** Tracking stem cells and macrophages with gold and iron oxide nanoparticles—The choice of the best suited particles. *Applied Materials Today.* 2019; 15: 267–279.

- Taylor-Brown F, Lamb CR, Tivers MS, Li A.** Magnetic resonance imaging for detection of late meniscal tears in dogs following tibial tuberosity advancement for treatment of cranial cruciate ligament injury. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2014; 27(2): 141–146.
- Van Bree, H, Degryse, H, Van Ryssen, B, Ramon, F, Desmidt, M.** Pathologic correlations with magnetic resonance images of osteochondrosis lesions in canine shoulders. *JAVMA.* 1993; 202(7): 1099–1105.
- Van Bruggen LW, Hazewinkel HA, Wolschrijn CF, Voorhout G, Pollak YW, Barthez PY.** Bone scintigraphy for the diagnosis of an abnormal medial coronoid process in dogs. *Vet Radiol Ultrasound.* 2010; 51(3): 344–348.
- Vaughan L.** Limb fractures in the dog and cat—II histological, clinical and radiographical aspects of fracture healing. *J Small Anim Pract.* 1966; 7(2): 141–146.
- Vermeire S, Audenaert K, Vandermeulen E, Waelbers T, De Spiegeleer B, van Bree H, Peremans K.** Single photon emission computed tomography (SPECT) imaging of the dopamine transporter in healthy dogs. *Vet J.* 2011; 188(3): 356–358.
- Wang SI, Mathews KG, Robertson ID, Stebbins M, Trumpatori BJ.** The effects of patient positioning and slice selection on canine acetabular angle assessment with computed tomography. *Vet Radiol Ultrasound.* 2005; 46(1): 39–43.
- Wantz GE und Frick EJ.** X-ray protection. *JAVMA.* 1937; 91: 571.
- Widmer WR, Buckwalter KA, Braunstein EM, Visco DM, O'Connor BL.** Principles of magnetic resonance imaging and application to the stifle joint in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1991; 198(11): 1914–1922.
- Winchell HS.** Radioactive tracers in medicine. *Hospital Practice.* 1971; 6(10): 49–60.
- Williamson HD, Herrtage ME, Douglas SW.** Principles of Veterinary Radiography. Baillière Tindall. 1963.
- Winegardner KR, Scrivani PV, Krotscheck U, Todhunter RJ.** Magnetic resonance imaging of subarticular bone marrow lesions in dogs with stifle lameness. *Vet Radiol Ultrasound.* 2007; 48(4): 312–317.
- Wucherer KL, Ober CP, Conzemius MG.** The use of delayed gadolinium enhanced magnetic resonance imaging of cartilage and T2 mapping to evaluate articular cartilage in the normal canine elbow. *Vet Radiol Ultrasound.* 2012; 53(1): 57–63.
- Ying J, Han Z, Zeng Y, Du Y, Pei S, Su L, Chen C.** Evaluation of intervertebral disc regeneration with injection of mesenchymal stem cells encapsulated in PEGDA-microcryogel delivery system using quantitative T2 mapping: a study in canines. *AJTR.* 2019; 11(4): 2028.
- Yuan Y, Wang C, Kuddannaya S, Zhang J, Arifin DR, Han Z, Walczak P, Liu G, Bulte JWM.** In vivo tracking of unlabelled mesenchymal stromal cells by mannose-weighted chemical exchange saturation transfer MRI. *Nat Biomed Eng.* 2022; 6(5): 658–666.
- Zweifel RT, DiDonato P, Hartmann A, Kramer M, von Pücker KH.** Improved computed tomography accuracy with a 1-mm versus 2- or 3-mm slice thickness for the detection of medial coronoid disease in dogs. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2020; 33(1): 45–50.
- Zyed A, Hayman LA, Bryan RN.** MR imaging of intracerebral blood: diversity in the temporal pattern at 0.5 and 1.0 T. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1991; 12(3): 469–474.

6.2. Literatur Wirbelsäule, Muskulatur und Gelenke

Wirbelsäule

- Amort KH, Ondreka N, Rudorf H, Stock KF, Distl O, Tellhelm B, Kramer M, Wigger A.** MR-imaging of lumbosacral intervertebral disc degeneration in clinically sound German shepherd dogs compared to other breeds. *Vet Radiol Ultrasound.* 2012; 53 (3): 289–295.
- Bailey CS, Morgan JP.** Congenital spinal malformations. *Vet Clin North Small Anim.* 1992; 22, 985–1015.
- Benninger MI, Seiler GS, Robinson LE, Ferguson SJ, Bonél HM, Busato AR, Lang J.** Effects of anatomic conformation on three-dimensional motion of the caudal lumbar and lumbosacral portions of the vertebral column of dogs. *Am J Vet Res.* 2006; 67 (1): 43–50.
- Burger R und Lang J.** Kinetische Studie "über die Lendenwirbelsäule und den lumbosakralen Übergang beim Deutschen Schäferhund Teil 1. *Schweiz Arch Tierheilk.* 1992; 134(9): 411–416.
- Burger R und Lang J.** Kinetische Studie "über die Lendenwirbelsäule und den lumbosakralen Übergang beim Deutschen Schäferhund. Teil 2: eigene Untersuchungen. *Schweiz Arch Tierheilk.* 1993; 135: 35–43.
- Damur-Djuric N, Steffen F, Hassig M.** Lumbosacral transitional vertebrae in dogs: classification, prevalence, and association with sacroiliac morphology. *Vet Radiol Ultrasound.* 2006; 47: 32–38.
- Dennis R.** Magnetic resonance imaging and its application in small animals. In *Practice* 1998; 20:117–124.
- Denny H, Gibbs C, Holt P.** The diagnosis and treatment of cauda equina lesions in the dog. *J Small Anim Pract.* 1982; 23: 425–443.
- Feeney DA und Wise M.** Epidurography in the normal dog: Technique and radiographic findings. *Vet Radiol Ultrasound.* 1981; 22: 35–39.
- Glyde M, Doyle R, McAllister H, Campoy L, Callanan JJ.** Magnetic resonance imaging in the diagnosis and surgical management of sacral osteochondrosis in a mastiff dog. *Vet Rec.* 2004; 155(3): 83–86.
- Hanna FY.** Lumbosacral osteochondrosis: radiological features and surgical management in 34 dogs. *J Small Anim Pract.* 200; 42(6): 272–278.
- Jaggy A, Lang J, Schawalder P.** Das cauda equina Syndrom beim Hund. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1987; 129: 171–192.
- Lang J, Häni H, Schawalder P.** A sacral lesion resembling osteochondrosis in the German shepherd dog. *Vet Radiol Ultrasound.* 1992; 33: 69–76.
- Marinelli NL, Haughton VM, Munoz A, Anderson PA.** T2 relaxation times of intervertebral disc tissue correlated with water content and proteoglycan content. *Spine.* 2009; 34: 520–524.
- Mathis KR, Havlicek M, Beck JB, Eaton-Wells RD, Park FM.** Sacral osteochondrosis in two German Shepherd Dogs. *Aust Vet J.* 2009; 87(6): 249–252.
- Mattoon JS und Koblik PD.** Quantitative survey radiographic evaluation of the lumbosacral spine of normal dogs and dogs with degenerative lumbosacral stenosis. *Vet Radiol Ultrasound.* 1993; 34: 194–206.
- Meji BP, Bergknut N.** Degenerative lumbosacral stenosis in dogs. *Vet Clin Small Anim.* 2010;40: 983–1009.

- Michal U, Steffen F, Hauser B, Damur D, Philipp M.** Osteochondrosis dissecans am Sakrum einer Berner Sennenhündin: Diagnostische und therapeutische Aspekte [Sacral osteochondrosis dissecans in a Bernese Mountain Dog: diagnosis and treatment]. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 2004 May; 146(5): 233–238.
- Moore GE, Burkman KD, Carter MN, Peterson MR.** Causes of death or reasons for euthanasia in military working dogs: 927 cases. *J Am Vet Med Assoc.* 2001; 219: 209–214.
- Morgan JP und Bailey CS.** Cauda equina syndrome in the dog: Radiographic evaluation. *J Small Anim Pract.* 1990; 31: 69–77.
- Niemelainen R, Videman T, Dhillon SS, Battié MC.** Quantitative measurement of intervertebral disc signal using MRI. *Clin Radiol.* 2008; 63: 252–255.
- Oliver JE, Selcer RR, Simpson S.** Cauda equina compression from lumbosacral malarticulation and malformation in the dog. *J Am Vet Med Assoc.* 1978; 173: 207–214.
- Rossi F, Seiler G, Busato A, Wacker C, Lang J.** Magnetic resonance imaging of articular process joint geometry and intervertebral disk degeneration in the caudal lumbar spine (L5-S1) of dogs with clinical signs of cauda equina compression. *Vet Radiol Ultrasound.* 2004; 45: 381–387.
- Scharf G, Steffen F, Grünenfelder F.** The lumbosacral junction in working German shepherd dogs neurological and radiological evaluation. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2003; 51: 27–32.
- Schaub KI, Kelleners N, Schmidt MJ, Eley N, Fischer MS.** Three-dimensional kinematics of the pelvis and caudal lumbar spine in German Shepherd dogs. *Front Vet Sci.* 2021; 8: 709966.
- Schmid V und Lang J.** Measurements on the lumbosacral junction in normal dogs and those with cauda equina compression. *J Small Anim Pract.* 1993; 34: 437–442.
- Seiler GS, Hani H, Busato AR, Lang J.** Facet joint geometry and intervertebral disk degeneration in the L5-S1 region of the vertebral column in German shepherd dogs. *Am J Vet Res.* 2002; 63: 86–90.
- Seiler GS, Häni H, Scheidegger J, Busato A, Lang J.** Staging of lumbar intervertebral disc degeneration in nonchondrodystrophic dogs using lowfield magnetic resonance imaging. *Vet Radiol Ultrasound.* 2003; 44: 179–184.
- Steffen F, Berger M, Morgan JP.** Asymmetrical, transitional, lumbosacral vertebral segments in six dogs: a characteristic spinal syndrome. *J Am Anim Hosp Assoc* 2004; 40 (4): 338–344.
- Suwankong N, Voorhout G, Hazewinkel HA, Meij BP.** Agreement between computed tomography, magnetic resonance imaging, and surgical findings in dogs with degenerative lumbosacral stenosis. *J Am Vet Med Assoc.* 2006; 229(12): 1924–1929.
- Suwankong N, Meij BP, Voorhout G.** Review and retrospective analysis of degenerative lumbosacral stenosis in 156 dogs treated by dorsal laminectomy. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2008; 21: 285–293.
- Videman T, Nummi P, Battié MC, Gill K.** Digital assessment of MRI for lumbar disc desiccation. A comparison of digital versus subjective assessments and digital intensity profiles versus discogram and macroanatomic findings. *Spine (Phila Pa 1976).* 1994; 19 (2): 192–198.
- Walla L.** Die Kompression der Cauda equina beim Hund. *Kleintierpraxis.* 1986; 3: 315–322.
- Watt PR.** Degenerative lumbosacral stenosis in 18 dogs. *J Small Anim Pract.* 1991; 32: 125–134.
- Wigger A, Julier-Franz C, Tellhelm B, Kramer M.** Lumbosacral transitional vertebrae in the German shepherd dog: Prevalence, classification, genetics, and association with canine hip dysplasia. *Tierärztliche Praxis Ausgabe Kleintiere Heimtiere.* 2009; 37: 7–13.

Winkler W und Loeffler K. Lumbosakrale Übergangswirbel beim Hund. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 1986; 99: 343–346.

Wright JA. Spondylosis deformans of the lumbosacral joint in dogs. J Small Anim Pract. 1980; 21: 45–58.

Muskulatur

Bencardino JT, Rosenberg ZS, Brown RR, Hassankhani A, Lustrin ES, Beltran J. Traumatic musculotendinous injuries of the knee: diagnosis with MR imaging. Radiographics 2000; 20: S103–120.

Dawid N und Mayrhofer E. Radiological diagnosis of insertion-tendopathies of the stifle joint in dogs. Wien Tierärztl Mschr. 1992; 79: 171–177.

Fiedler AM, Amort KH, Bokemeyer J, Kramer M. Musculotendinopathy of the gastrocnemius muscle in a Labrador Retriever. A case report. Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere. 2013; 41: 349–354.

Jacobson JA, Miller BS, Morag Y. Golf and racquet sports injuries. Semin Musculoskelet Radiol . 2005; 9: 346–359.

Koulouris G, Ting AY, Jhamb A, Connell D, Kavanagh EC. Magnetic resonance imaging findings of injuries to the calf muscle complex. Skeletal Radiol. 2007; 36: 921–927.

May DA, Disler DG, Jones EA, Balkissoon AA, Manaster BJ. Abnormal signal intensity in skeletal muscle at MR imaging: patterns, pearls, and pitfalls. Radiographics. 2000; 20: S295–315.

Millar AP. Strains of the posterior calf musculature (“tennis leg”). Am J Sports Med. 1979; 7: 172–174.

Mueller MC, Gradner G, Hittmair KM, Dupre G, Bockstahler BA. Conservative treatment of partial gastrocnemius muscle avulsions in dogs using therapeutic ultrasound – a force plate study. Vet Comp Orthop Traumatol 2009; 22: 243–248.

Palmer WE, Kuong SJ, Elmadbouh HM. MR imaging of myotendinous strain. Am J Roentgen. 1999; 173: 703–709.

Reinke JD. Cruciate ligament avulsion injury in the dog [Surgical techniques]. Journal American Animal Hospital Association. 1982.

Ridge PA, Owen MR. Unusual presentation of avulsion of the lateral head of the gastrocnemius muscle in a dog. J Small Anim Pract. 2005; 46(4): 196–198.

Robinson A. Atraumatic bilateral avulsion of the origins of the gastrocnemius muscle. J Small Anim Pract. 1999; 40: 498–500.

Stahl C, Wacker C, Weber U, Forterre F, Hecht P, Lang J, Gorgas D. MRI features of gastrocnemius musculotendinopathy in herding dogs. Vet Radiol Ultrasound. 2010; 51: 380–385.

Stevens MA, El-Khoury GY, Kathol MH, Brandser EA, Chow S. Imaging features of avulsion injuries. Radiographics. 1999; 19(3): 655–672.

Zyed A, Hayman LA, Bryan RN. MR imaging of intracerebral blood: diversity in the temporal pattern at 0.5 and 1.0 T. Am J Neuroradiol. 199; 12(3): 469–474.

Hüftgelenke

Adams WM, Dueland RT, Meinen J, O'Brien RT, Giuliano E, Nordheim EV. Early detection of canine hip dysplasia: comparison of two palpation and five radiographic methods. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1998; 34(4): 339–347.

Binversie EE, Momen M, Rosa GJM, Davis BW, Muir P. Across-breed genetic investigation of canine hip dysplasia, elbow dysplasia, and anterior cruciate ligament rupture using whole-genome sequencing. *Front Genet.* 2022; 13: 913354.

Fealey MJ, Li J, Todhunter RJE, Krotscheck U, Hayashi K, McConkey MJ, Boyko AR, Hayward JJ, Todhunter RJ. Genetic mapping of principal components of canine pelvic morphology. *Canine Genet Epidemiol.* 2017; 4: 4.

Franco-Gonçalo P, Moreira da Silva D, Leite P, Alves-Pimenta S, Colaço B, Ferreira M, Gonçalves L, Filipe V, McEvoy F, Ginja, M. Acetabular coverage area occupied by the femoral head as an indicator of hip congruency. *Animals.* 2022; 12: 2201.

Flückiger M. Scoring radiographs for canine hip dysplasia-the big three organisations in the world. *Eur. J. Companion Anim. Pract.* 2007; 17: 135–140.

Janssens L, De Ridder M, Verhoeven G, Gielen I, Van Bree H. Comparing Norberg angle, linear femoral overlap and surface femoral overlap in radiographic assessment of the canine hip joint. *J. Small Anim. Pract.* 2014; 55: 135–138.

Kyriazis A und Prassinos NN. Canine Hip Dysplasia I: Aetiopathogenesis & Diagnostic Approach. *Hell J Companion Anim Med.* 2016; 5: 22–47.

Loder RT und Todhunter RJ. The Demographics of Canine Hip Dysplasia in the United States and Canada. *J. Vet.-Med.* 2017; 5723476.

Merca R, Bockstahler B, Vezzoni A, Tichy A, Boano S, Vidoni B. Canine hip dysplasia screening: Comparison of early evaluation to final grading in 231 dogs with Fédération Cynologique Internationale A and B. *PLoS One.* 2020; 15(5): e0233257.

Mostafa AA, Nahla MA, Ali KM, Berry CR. Modified FCI (Fédération Cynologique Internationale) Scoring of the Coxofemoral Joint in Labrador Retrievers without and with Hip Dysplasia. *Front Vet Sci.* 2022; 9: 800237.

Pascual-Garrido C, Guilak F, Rai MF, Harris MD, Lopez MJ, Todhunter RJ, Clohisy JC. Canine hip dysplasia: A natural animal model for human developmental dysplasia of the hip. *J Orthop Res.* 2018; 36: 1807–1817.

Tellhelm B, Genevois JP, Hazewinkel H. Film Reading Session 3: Congruency/Incongruency, Craniolateral Rim, Subchondral Bone. In Proceedings of the FCI Hip Dysplasia Conference, Copenhagen, Denmark, 24–25 May 2022.

Tomlinson JL und Cook JL. Effects of degree of acetabular rotation after triple pelvic osteotomy on the position of the femoral head in relationship to the acetabulum. *Vet Surg.* 2002; 31: 398–403.

Tomlinson JL und Johnson JC. Quantification of measurement of femoral head coverage and Norberg angle within and among four breeds of dogs. *Am J Vet Res.* 2000; 6: 1492–1500.

Wigger A, Tellhelm B, Kramer M, Rudolf H. Influence of Femoral Head and Neck Conformation on Hip Dysplasia in the German Shepherd Dog. *Vet Radiol Ultrasound.* 2008; 49: 243–248.

Willemsen K, Möring, MM, Harlianto NI, Tryfonidou MA, van der Wal BCH, Weinans H, Meij BP, Sakkers RJB. Comparing Hip Dysplasia in Dogs and Humans: A Review. *Front Vet Sci.* 2021; 8: 791434.

Willemsen K, Tryfonidou M, Sakkers R, Castelein RM, Zadpoor AA, Seevinck P, Weinans H, Meij B, van der Wal BCH. Patient-specific 3D-printed shelf implant for the treatment of hip dysplasia: Anatomical and biomechanical outcomes in a canine model. *J Orthop Res.* 2022; 40: 1154–1162.

Kniegelenke

Barrett E, Barr F, Owen M, Bradley K. A retrospective study of the MRI findings in 18 dogs with stifle injuries. *J Small Anim Pract* 2009; 50(09): 448–455.

Blond L, Thrall DE, Roe SC, Chailleux N, Robertson ID. Diagnostic accuracy of magnetic resonance imaging for meniscal tears in dogs affected with naturally occurring cranial cruciate ligament rupture. *Vet Radiol Ultrasound.* 2008; 49(05): 425–431.

Case JB, Hulse D, Kerwin SC, Peycke LE. Meniscal injury following initial cranial cruciate ligament stabilization surgery in 26 dogs (29 stifles). *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2008; 21(04): 365–367.

Cook JL, Luther JK, Beetem J, Karnes J, Cook CR. Clinical comparison of a novel extracapsular stabilization procedure and tibial plateau leveling osteotomy for treatment of cranial cruciate ligament deficiency in dogs. *Vet Surg.* 2010; 39(03): 315–323.

David FH, Grierson J, Lamb CR. Reducing susceptibility artefacts in magnetic resonance images of the canine stifle following surgery for cranial cruciate ligament deficiency. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2012; 25(06): 488–497.

David FH, Grierson J, Lamb CR. Effects of surgical implants on high-field magnetic resonance images of the normal canine stifle. *Vet Radiol Ultrasound.* 2012; 53(03): 280–288.

Fitzpatrick N und Solano MA. Predictive variables for complications after TPLO with stifle inspection by arthrotomy in 1000 consecutive dogs. *Vet Surg.* 2010; 39(04): 460–474.

Gatineau M, Dupuis J, Planté J, Moreau M. Retrospective study of 476 tibial plateau levelling osteotomy procedures. Rate of subsequent 'pivot shift', meniscal tear and other complications. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2011; 24(05): 333–341.

Guermazi A, Miaux Y, Zaim S, Peterfy CG, White D, Genant HK. Metallic artefacts in MR imaging: effects of main field orientation and strength. *Clin Radiol.* 2003; 58(04): 322–328.

Haaland PJ und Sjöström L. Luxation of the long digital extensor tendon as a complication to tibial plateau levelling osteotomy. A presentation of four cases. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2007; 20 (03): 224–226.

Hargreaves BA, Worters PW, Pauly KB, Pauly JM, Koch KM, Gold GE. Metal-induced artifacts in MRI. *Am J Roentgenol.* 2011; 197 (03): 547–555.

Johnson JA, Austin C, Breur GJ. Incidence of canine appendicular musculoskeletal disorders in 16 veterinary teaching hospitals from 1980 through 1989. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 1994; 7: 56–69.

- Jones BG, Fosgate GT, Green EM, HabingAM, Hettlich BF.** Magnetic resonance imaging susceptibility artifacts in the cervical vertebrae and spinal cord related to monocortical screw polymethylmethacrylate implants in canine cadavers. *Am J Vet Res.* 2017; 78(04): 458–464.
- Kaiser SM, Harms O, Konar M, Staudacher A, Langer A, Thiel C, Kramer M, Schaub S, von Pückler KH.** Clinical, radiographic, and magnetic resonance imaging findings of gastrocnemius musculotendinopathy in various dog breeds. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2016; 29(06): 515–521.
- Oei EH, Ginai AZ, Hunink MG.** MRI for traumatic knee injury: a review. *Semin Ultrasound CT MR.* 2007; 28(02): 141–157.
- Pacchiana PD, Morris E, Gillings SL, Jessen CR, Lipowitz AJ.** Surgical and postoperative complications associated with tibial plateau leveling osteotomy in dogs with cranial cruciate ligament rupture: 397 cases (1998–2001). *J Am Vet Med Assoc.* 2003; 222(02): 184–193.
- Pieske O, Geleng P, Zaspel J, Piltz S.** Titanium alloy pins versus stainless steel pins in external fixation at the wrist: a randomized prospective study. *J Trauma.* 2008; 64(05): 1275–1280.
- Sage JE, Gavin P.** Musculoskeletal MRI. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2016; 46(03): 421–451.
- Soultanis KC, Pyrovolou N, Zahos KA, Karaliotas GI, Lenti A, Liveris I, Babis GC, Soucacos PN.** Late postoperative infection following spinal instrumentation: stainless steel versus titanium implants. *J Surg Orthop Adv.* 2008; 17(03): 193–199.
- Suh JS, Jeong EK, Shin KH, Cho JH, Na JB, Kim DH, Han CD.** Minimizing artifacts caused by metallic implants at MR imaging: experimental and clinical studies. *Am J Roentgenol.* 1998; 171(05): 1207–1213.
- Sutherland-Smith J, Tilley B.** Magnetic resonance imaging metallic artifact of commonly encountered surgical implants and foreign material. *Vet Radiol Ultrasound.* 2012; 53(03): 312–317.
- Taylor-Brown F, Lamb CR, Tivers MS, Li A.** Magnetic resonance imaging for detection of late meniscal tears in dogs following tibial tuberosity advancement for treatment of cranial cruciate ligament injury. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2014; 27(02): 141–146.
- Thieman KM, Tomlinson JL, Fox DB, Cook C, Cook JL.** Effect of meniscal release on rate of subsequent meniscal tears and owner assessed outcome in dogs with cruciate disease treated with tibial plateau leveling osteotomy. *Vet Surg.* 2006; 35(08): 705–710.

6.3 Literatur Ellenbogengelenkdysplasie

- Allan G, Davies S.** Radiographic signs of joint disease in dogs and cats. Thrall DE. Textbook of Veterinary Diagnostic Radiology. 7. Aufl. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2018: 403–433.
- Bardet JF.** Arthroscopy of the elbow in dogs. Part II: Cranial portals in the diagnosis and treatment of the lesions of the coronoid process. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 1997; 10(2): 60–66.
- Berry CR.** Radiology corner evaluation of the canine elbow for fragmented medial coronoid process. *Vet Radiol Ultrasound.* 1992; 33(5): 273–276.
- Burton NJ, Perry MJ, Fitzpatrick N, Owen MR.** Comparison of bone mineral density in medial coronoid process of dogs with and without medial coronoid process fragmentation. *Am J Vet Res.* 2010; 71(1): 41–46.
- Burton NJ, Warren-Smith CM, Roper DP, Parsons KJ.** CT assessment of the influence of dynamic loading on physiological incongruency of the canine elbow. *J Small Anim Pract.* 2013; 54(6): 291–298.
- Carpenter LG, Schwarz PD, Lowry JE, Park RD, Steyn PF.** Comparison of radiologic imaging techniques for diagnosis of fragmented medial coronoid process of the cubital joint in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1993; 203(1): 78–83.
- Cook CR und Cook JL.** Diagnostic imaging in canine elbow dysplasia: a review. *Vet Surg.* 2009; 38: 144–153.
- Dickomeit MJ, Böttcher P, Hecht S, Liebich HG, Maierl J.** Topographic and age-dependent distribution of subchondral bone density in the elbow joint of clinically normal dogs. *Am J Vet Res.* 2011; 72(4): 491–499.
- Draffan D, Carrera I, Carmichael S, Heller J, Hammond G.** Radiographic analysis of trochlear notch sclerosis in the diagnosis of osteoarthritis secondary to medial coronoid disease. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2009; 22(1): 7–15.
- Ei-Bably SH und Noor NA.** Anatomical, radiological and magnetic resonance imaging on the normal stifle joint in red fox (*Vulpes vulpes*). *Int J Anat Res.* 2017; 5(4.3): 4760–4769.
- Fitzpatrick N, Smith TJ, Evans RB, Yeadon R.** Radiographic and arthroscopic findings in the elbow joints of 263 dogs with medial coronoid disease. *Vet Surg.* 2009; 38(2): 213–223.
- Fitzpatrick N, Garcia TC, Daryani A, Bertran J, Watari S, Hayashi K.** Micro-CT structural analysis of the canine medial coronoid disease. *Vet Surg.* 2016; 45(3): 336–346.
- Flückiger M.** Radiographic diagnosis of elbow dysplasia in the dog: Requirements for the IEWG standardized screening procedure. In: IEWG Proceedings of the 25th Annual Meeting of the International Elbow Working Group. Bologna; 2010: 8–13.
- Gemmill TJ, Clements DN.** Fragmented coronoid process in the dog. Is there a role of incongruency? *J Small Anim Pract.* 2007; 48(7): 361–368.
- Groth AM, Benigni L, Moores AP, Lamb CR.** Spectrum of computed tomographic findings in 58 canine elbows with fragmentation of the medial coronoid process. *J Small Anim Pract.* 2009; 50(1): 15–22.
- Grøndalen J und Grøndalen T.** Arthrosis in the elbow joint of young rapidly growing dogs. V. A pathoanatomical investigation. *Nord Vet Med.* 1981; 33(1): 1–16.

- Haudiquet PR, Marcellin-Little DJ, Stebbins ME.** Use of the distomedial-proximolateral oblique radiographic view of the elbow joint for examination of the medial coronoid process in dogs. *Am J Vet Res.* 2002; 63(7): 1000–1005.
- Holbein LM.** Vergleichende Untersuchung des Processus coronoideus medialis ulnae des caninen Ellbogengelenks: histologische und computertomographische Befunde [Dissertation]. Gießen: Justus-Liebig-Universität Gießen 2020.
- Hornof WJ, Wind AP, Wallack ST, Schulz KS.** Canine elbow dysplasia. The early radiographic detection of fragmentation of the coronoid process. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2000; 30(2): 257–266.
- Janutta V, Hamann H, Klein S, Tellhelm B, Distl O.** Genetic analysis of three different classification protocols for the evaluation of elbow dysplasia in German shepherd dogs. *J Small Anim Pract.* 2006; 47(2): 75–82.
- Janutta V, Distl O.** Review on canine elbow dysplasia: pathogenesis, diagnosis, prevalence and genetic aspect. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 2008; 115(5): 172–181.
- Karpenstein H.** Die computertomographische Morphologie und Anatomie des Ellbogengelenkes mit Schwerpunkt des Processus coronoideus medialis ulnae bei mit ED = 0 beurteilten Hunden spezieller Rassen [Dissertation]. Gießen: Justus-Liebig-Universität Gießen 2010.
- Klumpp S, Ondreka N, Amort K, Zwick M, Gesierich K, Engert M, Tacke S, Failing K, Kramer M.** Computed tomography morphology and anatomy of the elbow joint of specific dog breeds focusing on the medial coronoid process in ED 0 scored dogs. *Kleintierprax.* 2013; 58(2): 57–64.
- Kramer A, Holsworth IG, Wisner ER, Kass PH, Schulz KS.** Computed tomographic evaluation of canine radioulnar incongruence in vivo. *Vet Surg.* 2006; 35(1): 24–29.
- Kunst CM, Pease AP, Nelson NC, Habing G, Ballegeer EA.** Computed tomographic identification of dysplasia and progression of osteoarthritis in dog elbows previously assigned OFA grades 0 and 1. *Vet Radiol Ultrasound.* 2014; 55(5): 511–520.
- Lang J, Busato A, Baumgartner D, Flückiger M, Weber UT.** Comparison of two classification protocols in the evaluation of elbow dysplasia in the dog. *J Small Anim Pract.* 1998; 39(4): 169–174.
- Lappalainen AK, Mölsä S, Liman A, Snellman M, Laitinen-Vapaavuori O.** Evaluation of accuracy of the Finnish elbow dysplasia screening protocol in Labrador retrievers. *J Small Anim Pract.* 2013; 54(4): 195–200.
- Mariee IC, Gröne A, Theyse LF.** The role of osteonecrosis in canine coronoid dysplasia: arthroscopic and histopathological findings. *Vet J.* 2014; 200(3): 382–386.
- Meyer-Lindenberg A, Langhann A, Fehr M, Nolte I.** Arthrotomy versus arthroscopy in the treatment of the fragmented medial coronoid process of the ulna (FCP) in 421 dogs. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2003; 16(04): 204–210.
- Moore AP, Benigni L, Lamb CR.** Computed tomography versus arthroscopy for detection of canine elbow dysplasia lesions. *Vet Surg.* 2008; 37(4): 390–398.
- Oltersdorf B.** Retrospektive computertomographische Studie zum Vergleich der Knochendichte des Processus coronoideus medialis ulnae von Hunden unterschiedlicher Rassen mit und ohne arthroskopischem Hinweis auf eine Koronoiderkrankung [Dissertation]. Gießen: Justus-Liebig-Universität Gießen; 2015.
- Ozkadif S, Haligur A, Eken E.** A three-dimensional reconstructive study of pelvic cavity in the red fox (*Vulpes vulpes*). *Anatomia, Histologia, Embryologia.* 2022; 51(2): 215–220.

- Rau FC, Wigger A, Tellhelm B, Zwick M, Klumpp S, Neumann A, Oltersdorf B, Amort K, Failing K, Kramer M.** Observer variability and sensitivity of radiographic diagnosis of canine medial coronoid disease. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere*. 2011; 39: 313–322.
- Reichle JK, Snaps F.** The elbow. *ClinTech Small Anim Pract*. 1999;14(3): 177–186.
- Reichle JK, Park RD, Bahr AM.** Computed tomographic findings of dogs with cubital joint lameness. *Vet Radiol Ultrasound*. 2000 Mar-Apr;41(2):125–130.
- Rohwedder T, Rebentrost P, Böttcher P.** Three-dimensional joint kinematics in a canine elbow joint with medial coronoid disease before and after bi-oblique dynamic proximal ulnar osteotomy. *Vet Comp Orthop Traumatol Open*. 2019; 2(2): e44–e49.
- Rovesti GL, Flückiger M, Margini A, Marcellin-Little DJ.** Fragmented coronoid process and incomplete ossification of the humeral condyle in a rottweiler. *Vet Surg*. 1998; 27(4): 354–357.
- Samii VF, Les Clifford M, Schulz KS, Keyak JH, Stover SM.** Computed tomographic osteosorptiometry of elbow joint in clinically normal dogs. *Am J Vet Res*. 2002; 63(8): 1159–1166.
- Snaps FR, Balligand MH, Saunders JH, Park RD, Dondelinger RF.** Comparison of radiography, magnetic resonance imaging, and surgical findings in dogs with elbow dysplasia. *Am J Vet Res*. 1997; 58(12): 1367–1370.
- Snaps FR, Saunders JH, Park RD, Daenen B, Balligand MH, Dondelinger RF.** Comparison of spin echo, gradient echo and fat saturation magnetic resonance imaging sequences for imaging the canine elbow. *Vet Radiol Ultrasound*. 1998; 39(6): 518–523.
- Temwichitr J, Leegwater PA, Hazewinkel HA.** Fragmented coronoid process in the dog: a heritable disease. *Vet J*. 2010; 185(2): 123–129.
- Tromblee TC, Jones JC, Bahr AM, Shires PK, Aref S.** Effect of computed tomography display window and image plane on diagnostic certainty for characteristics of dysplastic elbow joints in dogs. *Am J Vet Res*. 2007; 68(8): 858–871.
- Van Ryssen B, van Bree H.** Arthroscopic findings in 100 dogs with elbow lameness. *Vet Rec*. 1997; 140(14): 360–362.
- Van Bree HJ, Van Ryssen B.** Diagnostic and surgical arthroscopy in osteochondrosis lesions. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 1998 Jan;28(1):161–189.
- Vermote KA, Bergenhuyzen AL, Gielen I, van Bree H, Duchateau L, Van Ryssen B.** Elbow lameness in dogs of six years and older: arthroscopic and imaging findings of medial coronoid disease in 51 dogs. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2010; 23(1): 43–50.
- Villamonte-Chevalier A, van Bree H, Broeckx B, Dingemans W, Soler M, Van Ryssen B, Gielen I.** Assessment of medial coronoid disease in 180 canine lame elbow joints: a sensitivity and specificity comparison of radiographic, computed tomographic and arthroscopic findings. *BMC Vet Res*. 2015; 11: 243.
- Villamonte-Chevalier A, Dingemans W, Broeckx BJ, Van Caelenberg A, Agut A, Duchateau L, van Bree H, Gielen I.** Bone density of elbow joints in Labrador retrievers and Golden retrievers: comparison of healthy joints and joints with medial coronoid disease. *Vet J*. 2016; 216: 1–7.
- Voorhout G und Hazewinkel HA.** Radiographic evaluation of the canine elbow joint with special reference to the medial humeral condyle and the medial coronoid process. *Vet Radiol Ultrasound*. 1987; 28(5): 158–165.
- Wennemuth JH.** Studie zum Vergleich von röntgenologischen und computertomographischen Befunden am Processus coronoideus medialis ulnae im ED-Obergutachten [Dissertation]. Gießen 2017.

Wosar MA, Lewis DD, Neuwirth L, Parker RB, Spencer CP, Kubilis PS, Stubbs WP, Murphy ST, Shiroma JT, Stallings JT, Bertrand SG. Radiographic evaluation of elbow joints before and after surgery in dogs with possible fragmented medial coronoid process. *J Am Vet Med Assoc.* 1999; 214(1): 52–58.

6.4. Literatur Markierung von Zellen

Arbab AS, Yocum GT, Kalish H, Jordan EK, Anderson SA, Khakoo AY, Read EJ, Frank JA. Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI. *Blood.* 2004;104:1217–1223.

Arnhold S und Wenisch S. Adipose tissue derived mesenchymal stem cells for musculoskeletal repair in veterinary medicine. *Am J Stem Cells.* 2015; 4(01): 1–12.

Bartczak D, Nitti S, Millar TM, Kanaras AG. Exocytosis of peptide functionalized gold nanoparticles in endothelial cells. *Nanoscale.* 2012; 4(15): 4470–4472.

Barthélémy I, Thibaud JL, de Fornel P, Cassano M, Punzón I, Mauduit D, Vilquin JT, Devauchelle P, Sampaolesi M, Blot S. In vivo stem cell tracking using scintigraphy in a canine model of DMD. *Sci Rep.* 2020; 10(1): 10681.

Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, Ishiguro T, Okumura M, Iwanaga T, Kadosawa I, Fujinaga T. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells in pellet cultural system. *Exp Hematol.* 2004; 32: 502–9.

Bulte JW, Kraitchman DL, Mackay AM, Pittenger MF. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells is inhibited after magnetic labeling with ferumoxides. *Blood* 2004; 104(10): 3410–3412.

Bulte JWM. In vivo MRI cell tracking: clinical studies. *Am J Roentgenol.* 2009; 193: 314–325.

Brondeel C, Pauwelyn G, de Bakker E, Saunders J, Samoy Y, Spaas JH. Review: Mesenchymal stem cell therapy in canine osteoarthritis research: “Experientia docet. *Front Vet Sci.* 2021; 8: 668881.

Carré A, Klausner G, Edjlali M, Lerousseau M, Briend-Diop J, Sun R, Ammari S, Reuzé S, Alvarez Andres E, Estienne T, Niyoteka S, Battistella E, Vakalopoulou M, Dhermain F, Paragios N, Deutsch E, Oppenheim C, Pallud J, Robert C. Standardization of brain MR images across machines and protocols: bridging the gap for MRI based radiomics. *Sci Rep.* 2020; 10(01): 12340.

Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WC. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett.* 2006; 6(4): 662–668.

Comenge J, Fragueiro O, Sharkey J, Taylor A, Held M, Burton NC, Park BK, Wilm B, Murray P, Brust M, Lévy R. Preventing Plasmon Coupling between Gold Nanorods Improves the Sensitivity of Photoacoustic Detection of Labeled Stem Cells in Vivo. *ACS Nano.* 2016; 10(7):7106–7116. Erratum in: *ACS Nano.* 2018 Aug 28;12(8):8831.

Feliu N, Kohonen P, Ji J, Zhang Y, Karlsson HL, Palmberg L, Nyström A, Fadeel B. Next-generation sequencing reveals low-dose effects of cationic dendrimers in primary human bronchial epithelial cells. *ACS Nano.* 2015; 9(1): 146–163.

Feliu N, Hühn J, Zyuzin MV, Ashraf S, Valdeperez D, Masood A, Said AH, Escudero A, Pelaz B, Gonzalez E, Duarte MAC, Roy S, Chakraborty I, Lim ML, Sjöqvist S, Jungebluth P, Parak

- WJ.** Quantitative uptake of colloidal particles by cell cultures. *Sci Total Environ.* 2016; 568: 819–828.
- Frank JA, Miller BR, Arbab AS, Zywicke HA, Jordan EK, Lewis BK, Bryant LH, Bulte JWM.** Clinically applicable labeling of mammalian stem cells by combining superparamagnetic iron oxides and transfection agents. *Radiology.* 2003; 228: 480–487.
- Guo X, Wang C, Zhang Y, Xia R, Hu M, Duan C, Zhao Q, Dong L, Lu J, Qing Song Y.** Repair of large articular cartilage defects with implants of autologous mesenchymal stem cells seeded into β -tricalcium phosphate in a sheep model. *Tissue Eng.* 2004; 10(11-12): 1818–1829.
- Huňáková K, Hluchý M, Špaková T, Matejová J, Mudroňová D, Kuricová M, Rosocha J, Ledecký V.** Study of bilateral elbow joint osteoarthritis treatment using conditioned medium from allogeneic adipose tissue-derived MSCs in Labrador retrievers. *Res Vet Sci.* 2020; 132: 513–520.
- Hühn J, Carrillo-Carrion C, Soliman MG, Pfeiffer C, Valdeperez D, Masood A, Chakraborty I, Zhu L, Gallego M, Yue Z, Carril M, Feliu N, Escudero A, Alkilany AM, Pelai B, Del Pino P, Parak WJ.** Selected standard protocols for the synthesis, phase transfer, and characterization of inorganic colloidal nanoparticles. *Chemistry of Materials.* 2017; 29(1): 399–461.
- Ittrich H, Lange C, Dahnke H, Zander AR, Adam G, Nolte-Ernsting C.** Untersuchung zur Markierung von mesenchymalen Stammzellen mit unterschiedlichen superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln und Nachweisbarkeit in der MRT bei 3 T. Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren. 2005; 177: 1151–1163.
- Jackson DW, Scheer MJ, Simon TM.** Cartilage substitutes: overview of basic science and treatment options. *J Am Acad Orthop Surg.* 2001; 9(01): 37–52.
- Jin SE, Bae JW, Hong S.** Multiscale observation of biological interactions of nanocarriers: from nano to macro. *Microsc Res Tech.* 2010; 73(9): 813–823.
- Jülke H, Veit C, Ribitsch I, Brehm W, Ludewig E, Delling U.** Comparative labeling of equine and ovine multipotent stromal cells with superparamagnetic iron oxide particles for magnetic resonance imaging in vitro. *Cell Transplant.* 2015; 24(06): 1111–1125.
- Kazemi D, Shams Asenjan K, Dehdilani N, Parsa H.** Canine articular cartilage regeneration using mesenchymal stem cells seeded on platelet rich fibrin: macroscopic and histological assessments. *Bone Joint Res* 2017; 6(02): 98–107.
- Kedziorek DA und Kraitchman DL.** Superparamagnetic iron oxide labeling of stem cells for MRI tracking and delivery in cardiovascular disease. *Methods Mol Biol.* 2010; 660: 171–183.
- Kim SE, Pozzi A, Yeh JC, Lopez-Velazquez M, Au Yong JA, Townsend S, Dunlap AE, Christopher SA, Lewis DD, Johnson MD, Petrucci K.** Intra-articular umbilical cord derived mesenchymal stem cell therapy for chronic elbow osteoarthritis in dogs: a double-blinded, placebo-controlled clinical trial. *Front Vet Sci.* 2019; 6: 474.
- Kon E, Filardo G, Roffi A, Andriolo L, Marcacci M.** New trends for knee cartilage regeneration: from cell-free scaffolds to mesenchymal stem cells. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2012; 5(03): 236–243.
- Kolecka MA, Arnhold S, Schmidt M, Reich C, Kramer M, Failing K, von Pückler K.** Behaviour of adiposederived canine mesenchymal stem cells after superparamagnetic iron oxide nanoparticles labelling for magnetic resonance imaging. *BMC Vet Res.* 2017; 13(01): 62.
- Kostura L, Kraitchman DL, Mackay AM, Pittenger MF, Bulte JWM.** Feridex labeling of mesenchymal stem cells inhibits chondrogenesis but not adipogenesis or osteogenesis. *NMR Biomed.* 2004; 17(07): 513–517.

- Küstermann E, Himmelreich U, Kandal K, Geelen T, Ketkar A, Wiedermann D, Strecker C, Esser J, Arnhold S, Hoehn M.** Efficient stem cell labeling for MRI studies. *Contrast Media Mol Imaging*. 2008; 3(01): 27–37.
- Liu Y, Chen F, Liu W, Cui L, Shang Q, Xia W, Wang J, Cui Y, Yang G, Liu D, Wu J, Xu R, Buonocore SD, Cao Y.** Repairing large porcine full-thickness defects of articular cartilage using autologous chondrocyte-engineered cartilage. *Tissue Eng*. 2002; 8(04): 709–721.
- Lu SS, Liu S, Zu QQ, Xu XQ, Yu J, Wang JW, Zhang Y, Shi HB.** In vivo MR imaging of intraarterially delivered magnetically labeled mesenchymal stem cells in a canine stroke model. *PLoS One*. 2013; 8(02): e54963.
- Lucky SS, Soo KC, Zhang Y.** Nanoparticles in photodynamic therapy. *Chem Rev*. 2015; 115(4): 1990–2042.
- Ma X, Hartmann R, Jimenez de Aberasturi D, Yang F, Soenen SJH, Manshian BB, Franz J, Valdeperez D, Pelaz B, Feliu N, Hampp N, Riethmüller C, Vieker H, Frese N, Götzhäuser A, Simonich M, Tanguay RL, Liang XJ, Parak WJ.** Colloidal Gold Nanoparticles Induce Changes in Cellular and Subcellular Morphology. *ACS Nano*. 2017; 11(8): 7807–7820.
- Mantovani A, Allavena P, Marchesi F, Garlanda C.** Macrophages as tools and targets in cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2022; 21(11): 799–820.
- Meyer-Lindenberg und A, Kilchling T.** [Use of mesenchymal stemcells in dogs]. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere*. 2018; 46(06): 416–425.
- Nold P, Hackstein H, Riedlinger T, Kasper C, Neumann A, Mernberger M, Fölsch C, Schmitt J, Fuchs-Winkelmann S, Barckhausen C, Killer M, Neubauer A, Brendel C.** Immunosuppressive capabilities of mesenchymal stromal cells are maintained under hypoxic growth conditions and after gamma irradiation. *Cytotherapy*. 2015; 17(2): 152–162.
- Nold P, Hartmann R, Feliu N, Kantner K, Gamal M, Pelaz B, Hühn J, Sun X, Jungebluth P, Del Pino P, Hackstein H, Macchiarini P, Parak WJ, Brendel C.** Optimizing conditions for labeling of mesenchymal stromal cells (MSCs) with gold nanoparticles: a prerequisite for in vivo tracking of MSCs. *J Nanobiotechnology*. 2017; 15(1): 24. Erratum in: *J Nanobiotechnology*. 2019; 17(1): 98.
- Nohroudi K, Arnhold S, Berhorn T, Addicks K, Hoehn M, Himmelreich U.** In vivo MRI stem cell tracking requires balancing of detection limit and cell viability. *Cell Transplant*. 2008; 19: 431–441.
- Oh N und Park JH.** Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *Int. J. Nanomed*. 2014; 9 (Suppl. 1): 51–63.
- Olsson SE.** Pathology, morphology, and clinical signs of osteochondrosis in the dog. In: Bojrab MJ, Bloomberg M, Smeak D. eds. *Disease Mechanisms in Small Animal Surgery*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1993: 777.
- Parak WJ, Boudreau R, Gros ML, Gerion D, Zanchet D, Micheel CM, Williams SC, Alivisatos AP, Larabell CA.** Cell motility and metastatic potential studies based on quantum dot imaging of phagokinetic tracks. *Adv Mater*. 2002; 14(12): 882–885.
- Parak WJ, Pellegrino T, Plank C.** Labelling of cells with quantum dots. *Nanotechnology*. 2005 Feb; 16(2): R9–R25.
- Politi LS, Bacigaluppi M, Brambilla E, Cadioli M, Falini A, Comi G, Scotti G, Martino G, Pluchino S.** Magnetic resonance-based tracking and quantification of intravenously injected neural stem cell accumulation in the brains of mice with experimental multiple sclerosis. *Stem Cells*. 2007; 25: 2583–2592.
- Seonen SJH, Himmelreich U, Nuytten N, De Cuyper M.** Cytotoxic effects of iron oxide nanoparticles and implications for safety in cell labeling. *Biomaterials*. 2011; 32: 195–205.

- Shapiro EM, Skrtic S, Koretsky AP.** Sizing it up: cellular MRI using micronized iron oxide particles. *Magn Reson Med.* 2005; 53: 329–338.
- Shinohara RT, Sweeney EM, Goldsmith J, Shiee N, Mateen FJ, Calabresi PA, Jarso S, Pham DL, Reich DS, Crainiceanu CM.** Australian Imaging Biomarkers Lifestyle Flagship Study of Ageing Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Statistical normalization techniques for magnetic resonance imaging. *Neuroimage Clin.* 2014; 6: 9–19.
- Simmons A, Tofts PS, Barker GJ, Arridge SR.** Sources of intensity nonuniformity in spin echo images at 1.5 T. *Magn Reson Med.* 1994; 32(01): 121–128.
- Spriet M, Hunt GB, Walker NJ, Borjesson DL.** Scintigraphic tracking of mesenchymal stem cells after portal, systemic intravenous and splenic administration in healthy beagle dogs. *Vet Radiol Ultrasound.* 2015; 56(03): 327–334.
- Sykova E, Jendelova P.** Magnetic resonance tracking of transplanted stem cells in rat brain and spinal cord. *Neurodegenerative Diseases.* 2006; 3: 62–67.
- Thiede RM, Lu Y, Markel MD.** A review of the treatment methods for cartilage defects. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2012; 25(04): 263–272.
- Urdzikova L, Jendelova P, Glogarova K, Burian M, Hajek M, Sykova E.** Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rat. *J Neurotrauma.* 2006; 23: 1379–1391.
- Wegner KD und Hildebrandt N.** Quantum dots: bright and versatile in vitro and in vivo fluorescence imaging biosensors. *Chem Soc Rev.* 2015; 44(14): 4792–4834.
- Wilhelm S, Tavares AJ, Dai Q, Ohta S, Audet J, Dvorak HF, Chan WC.** Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nature reviews materials.* 2016; 1(5): 1–12.
- Xie J, Peng S, Brower N, Pourmand N, Wang SX, Sun S.** One-pot synthesis of monodisperse iron oxide nanoparticles for potential biomedical applications. *Pure and Applied Chemistry.* 2006; 78(5): 1003–1014.
- Xu M, Soliman MGM, Sun X, Pelaz B, Feliu N, Parak WJ, Liu S.** Towards the prediction of protein corona formation and in vitro and in vivo interactions of gold nanoparticles based on their physicochemical properties, *ACS Nano.* 2018; 12(10): 10104–10113.
- Yeh TC, Zhang W, Ildstad ST, Ho C.** Intracellular labeling of T-cells with superparamagnetic contrast agents. *Magn Reson Med.* 1993; 30(5): 617–625.
- Yoo JH, Park C, Jung DI, Lim CY, Kang BT, Kim JH, Park JW, Kim JH, Park HM.** In vivo cell tracking of canine allogenic mesenchymal stem cells administration via renal arterial catheterization and physiopathological effects on the kidney in two healthy dogs. *J Vet Med Sci.* 2011; 73(02): 269–274.
- Zhao Y, Ji T, Wang H, Li S, Zhao Y, Nie G.** Self-assembled peptide nanoparticles as tumor microenvironment activatable probes for tumor targeting and imaging. *J Control Release.* 2014; 177: 11–19.

7 KUMULATIVE PUBLIKATIONSLISTE

Originalarbeiten zum Kapitel 3.1

Studie 1

Amort, K.H., Ondreka, N., Rudorf, H., Stock, K.F., Distel, O., Tellhelm, B., Kramer, M., Wigger, A.

(2012):

MRI-imaging of lumbosacral intervertebral disc degeneration in clinically sound German Shepherd dogs compared to other breeds.

Veterinary Radiology and Ultrasound; 53(3): 289–295.

DOI:10.1111/j.1740-8261.2011.01903

Studie 2

Ondreka, N., **Amort, K.H.**, Stock, K.F., Tellhelm, B., Klumpp, S.W., Kramer, M., Schmidt, M.J.

(2013):

Skeletal morphology and morphometry of the lumbosacral junction in German shepherd dogs and an evaluation of the possible genetic basis for radiographic findings.

The Veterinary Journal; 196(1): 64–70.

DOI: 10.1016/j.tvjl.2012.07.015

Studie 3

Paulus, Ch., Brinkmeier, H.S., Jährig, R.A., Schaub, K., Büttner, K., Kramer, M., **von Pückler, K.**

(2022):

Verlaufsuntersuchung der lumbalen Bandscheiben- und Facettengelenkveränderungen bei 5 Deutschen Schäferhunden.

Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere; 50: 400–410.

DOI: 10.1055/a-1967-9782

Studie 4

Kaiser, S.M., Harms, O., Konar, M., Staudacher, A., Langer, A., Thiel, C., Kramer, M., Schaub, S., **von Pückler, K.H.** (2016):

Clinical, radiographic, and magnetic resonance imaging findings of gastrocnemius musculotendinopathy in various dog breeds.

Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology; 29: 515–552.

DOI: 10.3415/VCOT-16-01-0015

Studie 5

Fiedler, A.M., **Amort, K.H.**, Bokmeyer, J., Kramer, M. (2013):

Musculotendinopathy of the gastrocnemius muscle in a Labrador Retriever. A case report.

Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere; 45: 349–354.

DOI: 10.1055/s-0038-1623720

Studie 6

Pilli, M., Seyrek Intas, D., Etikan, I., Yigitgor, P., Kramer, M., Tellhelm, B., **von Pückler, K.** (2023):
The Role of Femoral Head Size and Femoral Head Coverage in Dogs with and without Hip Dys-
plasia.

Veterinary Science; 10(2): 120.

DOI:10.3390/vetsci10020120

Studie 7

Feichtenschlager, Ch., Gerwing, M., Failing K., Peppler, Ch. Kása, A. Kramer, M., von **Pückler, K.H.** (2018):

Magnetic Resonance Imaging Assessment of Intra-Articular Structures in the Canine Stifle Joint
after Implantation of a Titanium Tibial Plateau Levelling Osteotomy Plate.

Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology; 31: 261–272.

DOI:10.1055/s-0038-1647248

MR-IMAGING OF LUMBOSACRAL INTERVERTEBRAL DISC DEGENERATION IN CLINICALLY SOUND GERMAN SHEPHERD DOGS COMPARED TO OTHER BREEDS

KERSTIN H. AMORT, NELE ONDREKA, HEIKE RUDORF, KATHRIN F. STOCK, OTTMAR DISTL, BERND TELLHELM, MARTIN KRAMER, ANTJE WIGGER

German shepherd dogs are overrepresented in the group of dogs with cauda equina compression syndrome due to degenerative lumbosacral stenosis. A congenital predisposition for early degeneration of the lumbosacral intervertebral disc has been suspected. Our aims were to assess the morphologic appearance of the lumbosacral intervertebral disc and the lumbosacral junction in healthy German shepherd dogs compared to other breeds and to evaluate for an early onset of degenerative changes. The lumbosacral spine of 110 clinically sound German shepherd dogs and 47 healthy dogs of other large breeds was examined using magnetic resonance (MR) imaging. The degeneration of every intervertebral disc was graded using an established classification system. Signal intensity of the entire lumbosacral disc and the nucleus pulposus was determined independently. Lumbosacral malalignment was assessed according to a previously described method. The findings for the German shepherd dogs were compared to those of the other breeds. Although most dogs were younger than 18 months at the date of examination, significantly higher grades of degeneration were detected for the lumbosacral intervertebral disc of German shepherd dogs ($P < 0.003$). Degeneration of the lumbosacral intervertebral disc was independent from findings in the other lumbar discs. We conclude that the German shepherd dog has a predisposition for degenerative changes in the lumbosacral intervertebral disc. © 2012 *Veterinary Radiology & Ultrasound*.

Key words: German shepherd dog, intervertebral disc, lumbosacral junction, magnetic resonance imaging.

Introduction

DEGENERATIVE LUMBOSACRAL STENOSIS is the most common cause of cauda equina syndrome in large breed dogs. Herniation (Hansen type II) of the lumbosacral intervertebral disc associated with multiple hypertrophic degenerative changes such as articular process degenerative joint disease, spondylosis, and hypertrophy of the ligaments (e.g., ligamentum interarcuale and longitudinale dorsale) are common findings.¹⁻³ The German shepherd dog is the most commonly affected breed.³⁻⁷ A predisposing factor has not been identified and a multifactorial process was suspected, leading to early withdrawal of dogs from working programs.^{4,5} Conventional radiol-

ogy and computed tomography have been used to compare the lumbosacral junction of clinically sound and affected dogs.⁸⁻¹¹ Investigations on lumbosacral angle, range of motion, articular process joint angle, and articular process joint tropism as well as joint orientation have been conducted.^{8,11-15}

During the last decade, magnetic resonance (MR) imaging has become an important tool for the investigation of intervertebral disc degeneration.^{16,17} It offers a noninvasive method for the quantification of the water and proteoglycan content of intervertebral discs.^{18,19} The loss of these components represents the degree of intervertebral disc degeneration resulting in the decrease in signal intensity of the nucleus pulposus in fluid sensitive sequences.¹⁸ In a previous study of a cohort of 11 dogs, there was good agreement between a four-stage classification system using low-field MR imaging and histopathologic findings.⁷ The aims of the present study were to identify if sound German shepherd dogs below the age of 38 months have intervertebral disc degeneration at the lumbosacral junction (L7-S1) and if predisposing factors such as age, gender, presence of lumbosacral malalignment, transitional vertebrae, or osteochondrosis exist. We also compared lumbosacral disc degeneration of the German shepherd dog with other breeds.

From the Department of Veterinary Clinical Science, Small Animal Clinic, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany (Amort, Ondreka, Tellhelm, Kramer, Wigger), Institute of Animal Breeding and Genetics, University of Veterinary Medicine, Hannover Germany (Stock, Distl), and Radiology Consultancy Rheinbach, Rheinbach Germany (Rudorf).

This study was funded by the German National Merit Foundation and the German Shepherd Dog Breeding Association.

Parts of this paper were presented on 23 July 2010 at the annual EVDI meeting (EAVDI/ECVDI joint meeting) in Giessen, Germany.

Address correspondence and reprint requests to Kerstin H. Amort, Department of Veterinary Clinical Science, Small Animal Clinic-Surgery, Justus-Liebig-University Giessen, Frankfurter Street 108, 35392 Giessen, Germany. E-mail: Kerstin.H.Amort@vetmed.uni-giessen.de

Received January 19, 2011; accepted for publication October 31, 2011. doi: 10.1111/j.1740-8261.2011.01903.x

Vet Radiol Ultrasound, Vol. 53, No. 3, 2012, pp 289-295.

Materials and Methods

One hundred ten German shepherd dogs and 47 other large breed dogs without history and clinical signs of cauda equina compression syndrome at the date of examination were included in this study.⁶ All dogs underwent MR imaging at the request of their owners immediately after a routine hip dysplasia examination. While approximately one-third of the German shepherd dogs were female (40 dogs) and two-thirds were male (70 dogs), the non-German shepherd group had an almost equal gender distribution (26 female and 21 male dogs). The non-German shepherd dog group included the Labrador Retriever (16), Flat Coated Retriever (9), Golden Retriever (7), Rottweiler (5), Rhodesian Ridgeback (3), Newfoundland (3), Bernese Mountain dog (2), and Saint Bernard dog (2). The median age of the German shepherd dogs at the date of examination was 14 months (mean 17.5 months) with a range of 6–38 months. Non-German shepherd dogs had a median age of 15 months (mean 15.7 months) at the date of presentation, ranging from 8 to 29 months. Two-thirds of the dogs were younger than 18 months at the date of presentation. The age difference between the groups was not statistically significant.

The body weight of the German shepherd dogs and other large breed dogs was similar. German shepherd dogs (weight recorded in $n = 87$) had a mean body weight of 34.15 (5.28) kg (22–45 kg) while non-German shepherd dogs (weight recorded in $n = 43$) had a mean weight of 34.26 (8.9) kg (22–58 kg).

The dogs were premedicated with an intravenous injection of diazepam* and atropine sulphate† combined in one syringe. Anesthesia was induced with ketamine hydrochloride‡ and xylazine hydrochloride.§ After endotracheal intubation, anesthesia was maintained with isoflurane** and oxygen; all dogs were breathing spontaneously. MR imaging examinations were performed using a 1.0T superconductive system†† and a five-channel syn-spine-phased array coil.¶ The dogs were in dorsal recumbency with the hind limbs fully extended.

T2-weighted fast spin-echo sequences in sagittal and transverse planes and dorsally oriented T1-weighted gradient-echo sequences were used for the examination of all dogs. Sagittal and dorsal planes included the caudal lumbar spine from the level of the fourth lumbar to the first caudal vertebra (S1). Transverse images were obtained from L5 to S1 using multiple stacks. Slice thickness was 2.8 mm for the sagittal, 3 mm for the transverse, and 4 mm for the dorsal plane. Sagittally oriented images were

TABLE 1. Sequence Parameters

Type	Plane	TR (ms)	TE (ms)	FOV (mm)	Matrix	Slice (mm)	Gap (mm)	Flip angle
TSE T2	Sagittal	3500	115	440	567	2.8	0.3	90°
TSE T2	Transverse	3939	120	240	352	3	0.3	90°
GRE T1	Dorsal	13.7	6.9	240	304	4	2	25°

TABLE 2. Grading System 1. From Seiler et al. 2001

Grade	Anatomic structure	Histopathology	MRI
1	Nucleus pulposus	Normal	High signal intensity in T2
	Annulus fibrosus	Normal	Continuous fibers in T1
2	Vertebral body	Normal	Normal
	Nucleus pulposus	Degenerated	Decreased signal intensity in T2 or nuclear cleft
3	Annulus fibrosus	Normal	Normal
	Vertebral body	Normal	Normal
4	Nucleus pulposus	Degenerated	Decreased signal intensity in T2 or nuclear cleft
	Annulus fibrosus	Defects, protrusion	Annular tear, disc herniation
4	Vertebral body	Normal	Normal
	Nucleus pulposus	Degenerated	Decreased signal intensity in T2 or nuclear cleft
4	Annulus fibrosus	Defects, protrusion	Annular tear, disc herniation
	Vertebral body	Spondylosis	Spondylosis

aligned parallel to the spinous processes of the lumbar spine with one slice in the midsagittal plane. Transverse images were obtained parallel to the examined discs L5–S1, with the central slice at the maximum extent of the nucleus pulposus. Dorsal images were oriented along the vertebral canal and included the vertebral canal and intervertebral discs. The parameters for the sequences are given in Table 1.

After scanning, numbers were assigned randomly to all MR images and identifying information removed from the images. All measurements were performed twice using a dedicated computer software program.‡‡

Midsagittal T2-weighted images served as the basis for classification of intervertebral disc degeneration between the fifth lumbar vertebra and the sacrum (L5–S1). According to a prior classification system (Seiler grading system), four stages of disc degeneration were differentiated using T2-weighted sagittal images.⁷ The signal intensity of the nucleus pulposus, the integrity of the annulus fibrosus and endplate, as well as the presence of a new bone formation were assessed (Table 2).

Transverse T2-weighted images, including the entire intervertebral disc and the maximum extent of the nucleus pulposus, were used to measure the cross-sectional area (region of interest [ROI]) of the entire lumbosacral disc

*Diazepam-ratiopharm, Ulm, Germany.

†Atropinsulfat B.Braun, Melsungen, Germany.

‡Ketamin 10%, Medistar, Ascheberg, Germany.

§Xylazin 2% Bernburg, Medistar, Ascheberg, Germany.

**IsoFlo, Albrecht Aulendorf, Germany.

††Philips Intera Gyroscan 1.0, Philips Healthcare, Hamburg, Germany.

‡‡Philips DICOM Viewer 2.4.



FIG. 1. T2-weighted transverse oriented image of the intervertebral disc L7–S1: a region of interest was drawn around the entire disc and around the high signal intensity representing the nucleus pulposus. The small inserts show the computed histogram representing the distribution of signal intensities in the region of interest.

as well as that of the lumbosacral nucleus pulposus. A freehand tool was used to first trace the outline of the intervertebral disc and then the nucleus pulposus (Fig. 1); dedicated software[#] was used to calculate the signal intensity and cross-sectional area for the entire lumbosacral intervertebral disc (L7–S1) as well as the outline of the nucleus pulposus of this disc (L7–S1).

Malalignment between the caudal endplate of L7 and the cranial endplate of S1 was assessed on midsagittal images. The method was from a report evaluating the radiographic appearance of the lumbosacral junction.⁸ The displacement of S1 with respect to L7 was identified by drawing a line along the dorsal aspect of the vertebral body of L7 and a second line, parallel to the first, along dorsal edge of the cranial endplate of the sacrum. The distance between the two lines therefore indicated the extent of malalignment.⁸ Dorsally oriented T1-weighted images were used to identify associated changes such as osteochondrosis and transitional vertebrae and these were recorded as either present (1) or absent (0). All measurements were analyzed using descriptive methods (mean and standard deviation [SD]). Statistical procedures included analysis of variance (General Linear Model, Statistical Analysis System Version 9.2) and Pearson's correlation coefficient (CORR, Statistical Analy-

sis System Version 9.2).^{§§} Multiple multivariate linear models were developed. Effects of breed, gender, and age were evaluated as differences of least square means. Regression parameters were used as effect estimators for continuous variables such as age. Agreement between observed data and modes was verified by residual analysis. Relationship between the grading system and morphologic parameters and the grading system and signal intensity measurements was analyzed. A probability (*P*) value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Using the grading system for disc degeneration, most of the German shepherd dogs had degeneration grades 3 (55 [50%]) and 4 (29 [26%]) with a mean of 2.81 (0.12) and a range of 1–4 in the lumbosacral intervertebral disc. There was no dependency between degeneration of the lumbosacral intervertebral disc and the appearance of the other intervertebral discs (L5–L7). This was contrary to the non-German shepherd dog group where the lumbosacral intervertebral disc of 29 (62%) non-German shepherd dogs were

^{§§}SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2009).

TABLE 3. Results for the Grading System and Probability for the Influence of Breed and Gender on the Results: Intervertebral Discs (IVD) from the Fifth Lumbar (L5) to the First Sacral Vertebra (S1). The Difference L7–S1 between German Shepherd Dogs (GSD) and Non-German Shepherd Dogs (Non-GSD) Proved to be Significantly Influenced by Breed. The Difference L5–L6 between Female and Male Non-GSD Proved to be Significantly Influenced by Breed (GSDs: *n* = 110, Non-GSDs: *n* = 47). Significant Differences are Highlighted

		Grading system Mean (range)	<i>P</i> -value	Female Mean (range)	Male Mean (range)	<i>P</i> -value
GSD	IVD L5–L6	2.01 ± 0.08 (1–3)	0.184	2.00 ± 0.13 (1–3)	2.02 ± 0.09 (2–3)	0.828
	IVD L6–L7	2.04 ± 0.07 (1–4)	0.491	2.11 ± 0.11(2–4)	1.97 ± 0.08 (1–4)	0.058
	IVD L7–S1	2.81 ± 0.12 (1–4)	<0.003	2.87 ± 0.19 (2–4)	2.76 ± 0.14 (1–4)	0.375
Non-GSD	IVD L5–L6	1.91 ± 0.12 (1–3)	0.184	2.04 ± 0.15 (1–4)	1.78 ± 0.19 (1–4)	0.034
	IVD L6–L7	2.00 ± 0.10 (1–3)	0.491	1.95 ± 0.13 (1–3)	2.04 ± 0.17 (1–4)	0.377
	IVD L7–S1	2.48 ± 0.18 (1–4)	<0.003	2.31 ± 0.23 (2–4)	2.65 ± 0.28 (2–4)	0.059

only graded as 2 (mean 2.48 [0.185] [range 1–4]). The differences between German shepherd dogs and non-German shepherd dogs concerning the grade of degeneration of the lumbosacral disc were statistically significant (*P* < 0.003) using the least square means method (Table 3).

For German shepherd dogs, there was no significant difference in intervertebral disc degeneration between male and female dogs. Within the non-German shepherd dogs, there was a significant difference (*P* = 0.034) in the degree of degeneration regarding gender at the level of the intervertebral disc L5–L6: female dogs had an estimated mean grade of 2.04 (range 1–4) while male dogs were graded as 1.78 (range 1–4) (Table 3). Age significantly influenced the grade of degeneration of the intervertebral discs L6–L7 (*P* = 0.039) and L7–S1 (*P* < 0.001) in all dogs (German shepherd dogs and non-German shepherd dogs). Higher degeneration grades were observed in older dogs.

Assessment of the cross-sectional area of the lumbosacral intervertebral disc of German shepherd dogs was 544.56 (107.45) mm²; range 168.5–980.0 mm². The lumbosacral intervertebral disc of non-German shepherd dogs had a significantly smaller cross-sectional area (478.15 [122.19] mm²; range 302.0–890.0 mm²) (*P* < 0.001) (Table 4).

Male German shepherd dogs (552.07 mm²; range 528.73–575.41 mm²) had larger discs than female German shepherd dogs (510.06 mm²; range 479.51–540.60 mm²) (*P* < 0.033). No such difference was found in the group

of non-German shepherd dogs. Results of the least square means method suggested that the cross-sectional area was significantly age dependent. It increased with increasing age of the dogs (*P* < 0.001).

The L7–S1 intervertebral disc of German shepherd dogs had significantly (*P* < 0.001) lower signal intensity (196.03 [73.56] units) than those of non-German shepherd dogs (268.18 [79.98] units). There was no significant influence of gender. Signal intensity decreased significantly (*P* < 0.001) with age.

Neither breed, gender nor age had a significant influence on the size of the cross-sectional area of the lumbosacral nucleus pulposus in any of the dogs examined.

The L7–S1 nucleus pulposus of German shepherd dogs had a significantly lower signal (491.05 [191.37] units; range 104.1–1060.0 units) (*P* < 0.002) than that of other dogs (674.05 [252.82] units; range 55.6–1321.7 units). Based on the ROI, no gender influence was detected but in all dogs, age had a significant influence on the signal intensity of the nucleus pulposus (*P* < 0.001). The signal intensity decreased with increasing age.

There was a negative association between grade of degeneration and signal intensity (*r* = –0.524 for entire intervertebral disc intensity and *r* = –0.406 for nucleus pulposus intensity). Intervertebral discs with higher degrees of degeneration had lower signal intensities.

There was a significant difference in the degree of malalignment that was 1.8 times higher in German

TABLE 4. Region of Interest (ROI), Signal Intensity, and Standard Deviation (Signal Std.dev.) of the Signal Intensity of the Intervertebral Disc and Nucleus Pulposus L7–S1 in GSDs in Comparison to Non-GSDs. Significant Differences are Highlighted

Region of interest		GSD Mean ± SD (range)	Non-GSD Mean ± SD (range)	<i>P</i> -value
Intervertebral disc	ROI (mm ²)	544.56 ± 107.45 (168.5–980.0)	478.15 ± 122.19 (302.0–890.0)	<0.001
	Signal intensity (units)	196.03 ± 73.56 (61.0–382.0)	268.18 ± 79.98 (91.0–445.9)	<0.001
	Signal Std.dev. (units)	223.68 ± 101.94	314.41 ± 102.13	0.004
Nucleus pulposus	ROI (mm ²)	134.70 ± 79.00 (0–419.8)	139.07 ± 117.87 (0–809.0)	0.881
	Signal intensity (units)	491.05 ± 191.37 (104.1–1060.0)	674.05 ± 252.82 (55.6–1321.7)	0.002
	Signal Std.dev. (units)	208.03 ± 119.71	325.88 ± 132.66	0.027

shepherd dogs (2.85 [1.16]; range 0–8.0 mm) compared to non-German shepherd dogs (1.48 [1.5]; range 0–5 mm) ($P < 0.007$). The correlation of malalignment to degeneration grade of the disc was low ($r = 0.227$).

Osteochondrosis of the cranial endplate of the sacrum was detected in five (4.5%) German shepherd dogs while no non-German shepherd dog had an osteochondritic lesions. A lumbosacral transitional vertebra was observed in 10 (11%) of the German shepherd dogs and eight (8.8%) of the non-German shepherd dogs. Due to the low number, binary criteria could not be taken into account in correlating statistical procedures.

Discussion

Young (17.5 months old German shepherd dogs and 15.7 months old non-German shepherd dogs) and clinically normal dogs were examined in the present study, because the investigation of young dogs minimizes the influence of environmental factors (training level, work load) and facilitates the analysis of early changes of the intervertebral disc morphology. Despite the young age, the lumbosacral intervertebral disc of German shepherd dogs showed significantly lower signal intensities and higher degeneration grades compared to non-German shepherd dogs. Although the body weight of two-thirds of the dogs was recorded, body weight was not included in the statistical analysis because of its strong correlation with age that was one of the major factors in the analysis of variance and regression.

The grading system we used for classification of lumbosacral intervertebral disc degeneration had a high correlation to histologic changes of the lumbosacral intervertebral disc.⁷ In the present study, German shepherd dogs had a significantly higher mean degeneration grade compared to non-German shepherd dogs. The significance of the difference in disc degeneration between German shepherd dogs and non-German shepherd dogs was substantial ($P < 0.003$). There was no association between degeneration of the lumbosacral disc and degeneration of the discs at other levels that supports a predisposition for lumbosacral disc degeneration in young German shepherd dogs. This finding is consistent with the results of previous reports and may be the result of increased stress at this level.^{8,15}

Male dogs may be affected more frequently by degenerative lumbosacral stenosis due to intervertebral disc degeneration.²⁰ This was not confirmed in the present study. However, the L5–L6 intervertebral disc in non-German shepherd dog was characterized by higher degeneration grades for female dogs (2.04 vs. 1.78). The reason for this finding is unclear.

As expected, there was a significant influence of age on degeneration grade with older dogs showing higher grades of disc degeneration. This may be partially explained by a

physiological ageing of the intervertebral disc. In the German shepherd breed, however, there seems to be an exaggerated response.

German shepherd dogs had a larger ROI of the entire intervertebral disc than non-German shepherd dogs. This may be influenced by the unequal gender distribution in this group and the fact that male German shepherd dogs had a larger intervertebral disc L7–S1 than females. No gender influences were observed in the non-German shepherd dog group. A proportional size difference between male and female dogs within breeds has been reported and may also influence the size of the intervertebral disc.²¹ In the non-German shepherd dog group, the heterogenous breed composition may have obscured the gender specific dimension of the intervertebral disc.

The ROI was also significantly influenced by age with the intervertebral disc being larger in older dogs. This may be influenced by growth of the dogs and therefore growth of the intervertebral disc. On the other hand, the cross-sectional area of the intervertebral disc becomes larger when disc material protrudes over the surface of the former disc borders. We did not differentiate between protrusion and physiological enlargement.

Signal intensity of the L7–S1 intervertebral disc was lower in German shepherd dogs. This underlines the suspicion of a hydrogen loss of the intervertebral disc in German shepherd dogs in the course of degeneration and also underlines the results of the grading system in an objective way. No difference has been observed between female and male dogs in contrast to previous studies, where a predisposition for degeneration of the intervertebral disc was suspected for male dogs.⁸ As expected, decreasing signal intensity was positively correlated to age.

Intensity measurements including the complete intervertebral disc appear to be more reliable for the estimation of signal intensity than measurements of the nucleus pulposus alone. Particularly, the nucleus pulposus of degenerated intervertebral discs lacks sufficient definition to be identified individually. This might lead to incorrect measurements.

Quantification of the degree of disc degeneration supports the results of subjective grading systems. As in several other studies, some limiting factors for characterizing signal intensity are the partial volume effect and a low signal-to-noise ratio. Field inhomogeneity also leads to false positive results. Methods for calculation of relative signal intensities are unreliable and were not used.²²

Additionally, older dogs had larger discs than younger dogs. However, the nucleus pulposus dimensions were comparable in the groups although the signal intensity for German shepherd dogs was lower. This demonstrates that the relationship between the nucleus pulposus and annulus fibrosus is different in German shepherd dogs in comparison to non-German shepherd dogs, and German shepherd dogs might have a larger annulus fibrosus to nucleus ratio

than other dogs. The increased distance from the nucleus pulposus to the vertebral endplate may lead to inadequate perfusion of the nucleus pulposus. Deficient nutrition of the nucleus is a possible cause of the early onset of intervertebral disc degeneration.

One of the most remarkable findings included the malalignment between the lumbar spine and sacrum. German shepherd dogs had a mean malalignment of 2.85 mm that was 1.8 times higher than for other breeds ($P < 0.007$). In a study of clinically affected dogs, the mean malalignment measured with the use of MR imaging, was 2.24 mm (1.37), and it was suggested that a lumbosacral malalignment as small as 2 mm may be clinically relevant, particularly in combination with disc protrusion.²³

Others suggest that malalignment of more than 4 mm is clinically relevant in the development of cauda equina syndrome.⁸ It is still unclear if malalignment at the lumbosacral junction is a primary or a secondary change. In our study, malalignment was also observed in young dogs. This supports the idea of malalignment representing a primary malformation although the significance of correlation to degeneration grade was low.

The findings on osteochondrosis and transitional vertebra in our study were similar to those reported previously.^{24–27}

To avoid bias, the unequal distribution of males and females and the influence of gender were taken into account in the statistical analysis. The fact that neither intraobserver nor interobserver performance of the grading system is available is a limiting factor and validation of the grading systems should be considered.

No quotient for intervertebral disc width was used to normalize the acquired data. We compared the basic information resulting from the measurements, and the finding that female dogs have smaller intervertebral discs may be caused by differences in body mass and condition.

In conclusion, the lumbosacral intervertebral disc of young, clinically sound, German shepherd dogs was characterized by degenerative changes in a statistically relevant manner. Unfortunately, the cohort was too small for heritability estimates of the observed changes. A single morphologic parameter as a cause for the degeneration of the lumbosacral disc was not identified although most parameters were influenced by the breed and therefore a primary degeneration of the intervertebral disc cannot be ruled out.

ACKNOWLEDGMENT

Table 2 has been reprinted with kind permission of Gabriela Seiler.

REFERENCES

1. Oliver JE, Selcer RR, Simpson S. Cauda equina compression from lumbosacral malarticulation and malformation in the dog. *J Am Vet Med Assoc* 1978;173:207–214.
2. Denny H, Gibbs C, Holt P. The diagnosis and treatment of cauda equina lesions in the dog. *J Small Anim Pract* 1982;23:425–443.
3. Jaggy A, Lang J, Schawalder P. Das cauda equina Syndrom beim Hund. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1987;129:171–192.
4. Linn L, Bartels KE, Rochat MC, Payton ME, Moore GE. Lumbosacral stenosis in 29 military working dogs: epidemiologic findings and outcome after surgical intervention. *Vet Surg* 2003;32:21–29.
5. Moore GE, Burkman KD, Carter MN, Peterson MR. Causes of death or reasons for euthanasia in military working dogs: 927 cases. *J Am Vet Med Assoc* 2001;219:209–214.
6. Meji BP, Bergknut N. Degenerative lumbosacral stenosis in dogs. *Vet Clin Small Anim* 2010;40:983–1009.
7. Seiler GS, Häni H, Scheidegger J, Busato A, Lang J. Staging of lumbar intervertebral disc degeneration in nonchondrodystrophic dogs using low-field magnetic resonance imaging. *Vet Radiol Ultrasound* 2003;44:179–184.
8. Schmid V, Lang J. Measurements on the lumbosacral junction in normal dogs and those with cauda equina compression. *J Small Anim Pract* 1993;34:437–442.
9. Mattoon JS, Koblik PD. Quantitative survey radiographic evaluation of the lumbosacral spine of normal dogs and dogs with degenerative lumbosacral stenosis. *Vet Radiol Ultrasound* 1993;34:194–206.
10. Chambers JN, Selcer BA, Butler TW, Oliver JE, Brown J. A comparison of computed tomography and epidurography for the diagnosis of suspected compressive lesions at the lumbosacral junction in dogs. *Prog Vet Neurol* 1994;5:30–34.
11. Henninger W, Werner G. CT of the canine lumbosacral spine in extension-flexion rotation; part I: bony window. *Wien Tierarztl Monatsschr* 2002;89:142–151.
12. Seiler GS, Hani H, Busato AR, Lang J. Facet joint geometry and intervertebral disk degeneration in the L5-S1 region of the vertebral column in German shepherd dogs. *Am J Vet Res* 2002;63:86–90.
13. Bürger R, Lang J. Kinetische Studie über die Lendenwirbelsäule und den lumbosakralen Übergang beim Deutschen Schäferhund Teil 1. *Schweiz Arch Tierheilk* 1992;134(9):411–416.
14. Bürger R, Lang J. Kinetische Studie über die Lendenwirbelsäule und den lumbosakralen Übergang beim Deutschen Schäferhund. Teil 2: eigene Untersuchungen. *Schweiz Arch Tierheilk* 1993;135:35–43.
15. Rossi F, Seiler G, Busato A, Wacker C, Lang J. Magnetic resonance imaging of articular process joint geometry and intervertebral disk degeneration in the caudal lumbar spine (L5-S1) of dogs with clinical signs of cauda equina compression. *Vet Radiol Ultrasound* 2004;45:S.381–S.387.
16. Dennis R. Magnetic resonance imaging and its application in small animals. *In Practice* 1998;20:117–124.
17. Tobias KM, Seguin B, Pooya HA, Tucker RL, Gavin PR. Magnetic resonance imaging in small animal medicine: clinical application. *Compend Contin Ed* 2004;26:292–301.
18. Marinelli NL, Haughton VM, Munoz A, Anderson PA. T2 relaxation times of intervertebral disc tissue correlated with water content and proteoglycan content. *Spine* 2009;34:520–524.
19. Niemeläinen R, Videman T, Dhillon SS, Battié MC. Quantitative measurement of intervertebral disc signal using MRI. *Clin Radiol* 2008;63:252–255.
20. Oliver JE, Selcer RR, Simpson S. Cauda equina compression from lumbosacral malarticulation and malformation in the dog. *J Am Vet Med Assoc* 1978;173:207–214.
21. Sutter NB, Mosher DS, Gray MM, Ostrander EA. Morphometrics within dog breeds are highly reproducible and dispute Rensch's rule. *Mamm Genome* 2008;19:713–723.

22. Luoma K, Raininko R, Nummi P, Luukkonen R. Is the signal intensity of cerebrospinal fluid constant? Intensity measurements with high and low field magnetic resonance imagers. *Magn Reson Imaging* 1993;11:549–555.
23. Scharf G, Steffen F, Grünenfelder F. The lumbosacral junction in working German shepherd dogs-neurological and radiological evaluation. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2003;51:27–32.
24. Damur-Djuric N, Steffen F, Hassig M. Lumbosacral transitional vertebrae in dogs: classification, prevalence, and association with sacroiliac morphology. *Vet Radiol Ultrasound* 2006;47:32–38.
25. Lang J, Häni H, Schawalder P. A sacral lesion resembling osteochondrosis in the German shepherd dog. *Vet Radiol Ultrasound* 1992;33:69–76.
26. Morgan JP, Bahr A, Franti CE, Bailey CS. Lumbosacral transitional vertebrae as a predisposing cause of cauda equina syndrome in German shepherd dogs: 161 cases (1987–1990). *J Am Vet Med Assoc* 1993;202:1877–1882.
27. Wigger A, Julier-Franz C, Tellhelm B, Kramer M. Lumbosacral transitional vertebrae in the German shepherd dog: prevalence, classification, genetics, and association with canine hip dysplasia. *Tierarztl Prax* 2009;37:7–13.



Skeletal morphology and morphometry of the lumbosacral junction in German shepherd dogs and an evaluation of the possible genetic basis for radiographic findings

Nele Ondreka^{a,*}, Kerstin H. Amort^a, Kathrin F. Stock^b, Bernd Tellhelm^a, Stephan W. Klumpp^a, Martin Kramer^a, Martin J. Schmidt^a

^a Department of Veterinary Clinical Sciences, Small Animal Clinic, Justus-Liebig-University, Frankfurter Straße 108, 35392 Giessen, Germany

^b Institute of Animal Breeding and Genetics, University of Veterinary Medicine, Bünteweg 17p, 30559 Hannover, Germany

ARTICLE INFO

Article history:
Accepted 12 July 2012

Keywords:
Lumbosacral stenosis
Cauda equina syndrome
Heritability
Genetic
Dog

ABSTRACT

The aim of this study was to identify skeletal variations in the lumbosacral junction (LSJ) of the German shepherd dog (GSD) compared with other large breeds. The radiographic traits of the LSJ were investigated in a group of 733 GSDs and a control group of 334 dogs of other breeds that were matched in terms of size. Nine morphological and 17 morphometric traits were recorded and analysed. Furthermore, the possibility of a genetic basis for these radiographic features was evaluated by calculation of genetic variance components.

Five of the morphological and 14 of the morphometric traits varied significantly between the GSD group and the control group ($P < 0.05$). Osteochondrosis of the sacral endplate (SOC) had a higher prevalence in the GSDs (10.1%) compared with controls (5.7%). The majority of LSJ degenerative changes recorded from the radiographs occurred in the GSDs. The extent and relative proportion of lumbosacral step formations were greater in the GSD group compared with controls ($P < 0.001$). The lumbosacral vertebral canal height was reduced in the GSD compared with the control dogs ($P < 0.001$) suggesting a primary stenosis. This was accentuated by an abrupt tapering of the vertebral canal at the level of the LSJ indicated by a lumbosacral ratio of 1.51 in the GSD.

The skeletal morphology and morphometry of the LSJ in the GSD seem to be different from that found in other large dogs. For multiple traits frequently observed in GSD such as SOC, step formations, and LSJ stenosis, moderate to high non-zero heritabilities were noted. As these features are also assumed to promote lumbosacral disease, selection against these traits is suggested.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Cauda equina syndrome (CES) refers to a complex of clinical signs caused by lumbosacral vertebral canal stenosis and subsequent compression of the cauda equina nerve roots. The breed most commonly affected by clinical signs related to lumbosacral stenosis is the German shepherd dog (GSD) (Indrieri, 1988; Watt, 1991; Ness, 1994; Danielsson and Sjöström, 1999; DeRisio et al., 2000; Suwankong et al., 2008). The aetiopathogenesis of the disease is considered to be complex and congenital, developmental and acquired abnormalities may contribute to narrowing of the lumbosacral vertebral canal, nerve root compression, and progressive clinical signs (Lang et al., 1992; Morgan et al., 1993; DeRisio et al., 2000; Seiler et al., 2002; Flückiger et al., 2006; Meij and Bergknut, 2010).

Individual characteristics of lumbosacral morphology predisposing the GSD to CES have been identified in previous studies. Lumbosacral transitional vertebrae (LTV) and sacral osteochondrosis (SOC) are believed to contribute to the breed-predisposition for CES because of their pathological potential and frequent occurrence in the breed (Lang et al., 1992; Morgan et al., 1993; Hanna, 2001; Damur Djuric et al., 2006; Flückiger et al., 2006). There may be a genetic background for conditions promoting CES (Lang et al., 1992; Morgan et al., 1993; Damur Djuric et al., 2006; Flückiger et al., 2006), and at least partial genetic determination is indispensable in the justification and efficacy of breeding selection against traits predisposing the GSD to lumbosacral stenosis. However, to date, the only trait known to increase the risk of CES in which the genetic background has been investigated is LTV (Wigger et al., 2009) and these authors give a heritability range of 20–30% in the GSD. Information on the genetic involvement of many other skeletal characteristics of the lumbosacral junction (LSJ) is lacking.

* Corresponding author. Tel.: +49 641 9938500.

E-mail address: Nele.Ondreka@vetmed.uni-giessen.de (N. Ondreka).

A number of studies have examined the diagnostic value of several radiographic and tomographic features in the quest to differentiate between dogs with and those without clinical signs of CES (Mattoon and Koblik, 1993; Morgan et al., 1993; Schmid and Lang, 1993; Rossi et al., 2004; Scharf et al., 2004; Flückiger et al., 2006; Suwankong et al., 2006; Steffen et al., 2007). However, extensive interbreed comparisons regarding the general skeletal conformation of the LSJ have not been undertaken using normal dogs. In light of the high incidence of CES in GSDs, there is a need for comprehensive data on the general LSJ differences between GSDs and other dogs of similar size. Knowledge of the morphological and morphometric variations of the LSJ of GSDs compared to other large dogs would help to understand why GSDs are prone to lumbosacral disease.

The purpose of this study was to analyse the variation in congenital, developmental and acquired features of the LSJ between clinically normal GSD and dogs from other large breeds. Morphological and morphometric radiographic traits of the LSJ in a large population of GSDs were investigated and compared with a control group. We hypothesized that there is breed-specific variation in the radiographic morphology and morphometry of the lumbosacral region in the GSD. Furthermore, our aim was to determine potential genetic involvement in the development of phenotypic characteristics of the LSJ based upon the pedigree data of the GSD.

Materials and methods

Study design and patient material

The observational study was based on a retrospective analysis of radiographic material from the Small Animal Clinic, Department of Veterinary Clinical Sciences, University of Giessen. The study comprises a group of GSDs and a control group containing other canine breeds matched to the GSD in terms of size. All dogs were presented for the purpose of screening for canine hip dysplasia (CHD) according to the Fédération Cynologique Internationale (FCI). To meet the inclusion criteria of this study, the clinical histories of the dogs had to be devoid of back pain or gait abnormalities, and the medical records had to be negative for lumbosacral pain, hind limb ataxia, and neurological deficits at the time of presentation. To be included in the control group, the height of the withers of a specific breed had to overlap within the range 60–65 cm for males and 55–60 cm for females according to the breed standard of the FCI. For all dogs, a lateral radiograph of the pelvis in neutral position centered on the LSJ (Morgan, 1993) was available and had been obtained at the request of the owner.

Evaluation of radiographs

Image analysis was performed using a dedicated computer software program (DicomWorks 1.3.5 imaging software¹). All images were reviewed by a radiology resident (NO) who was unaware of the breed of the dog. In case of equivocal findings images were re-evaluated by the resident and a board-certified radiologist (BT), and consensus was reached.

Nine qualitative traits were evaluated and graded binary according to their absence (grade 0) or presence (grade 1). These included SOC, LTV identified by the presence of a radiolucent disc space between the first and second sacral segment, spondylosis deformans of the opposing lumbosacral vertebral endplates (SPON^{7/1}) and the opposing endplates of the lumbar vertebrae 6 and 7 (SPON^{6/7}), lumbosacral facet joint arthropathy (ARTH), sclerosis of the cranial sacral endplate (SCLER), opacification associated with the intervertebral disc space (O-DISC) or vertebral canal (O-CAN), and reduced delineation of the ventral contour of the sacral roof (ROOF). The morphological traits and their abbreviations are summarized in Table 1.

The following 17 quantitative morphometric traits were obtained from the radiographs and scaled as continuous measurements based on previously published methods (Wright, 1980; Feeney and Wise, 1981; Walla, 1986; Morgan and Bailey, 1990; Mattoon and Koblik, 1993; Schmid and Lang, 1993; Scharf et al., 2004). The metric measurements are quoted in mm, and the angles in degrees (°). Lumbosacral step formations (STEP) were measured at the level of the caudal endplate of L7 as the distance between two lines joining the dorsal contour of the vertebral bodies of L7 and S1. Width of the lumbosacral intervertebral space (IVS) was defined as the distance between the centers of the opposing lumbosacral endplates along a line dividing the vertebral body of S1 into equal halves. The lengths of the vertebral bodies of L6

(L_L6), L7 (L_L7), and S1 (L_S1) were measured as a line intersecting these vertebral bodies. The heights of the bodies of L6 (H_L6) and L7 (H_L7) were measured in the mid-portion of the vertebral bodies. The height of S1 (H_S1) was measured at the level of the cranial sacral endplate. The height of the vertebral canal was measured at six locations—the cranial and caudal endplate of L6 (CAN_L6_{CR}, CAN_L6_{CD}), L7 (CAN_L7_{CR}, CAN_L7_{CD}), and the sacrum (CAN_S1, CAN_S3). Table 2 summarizes the morphometric traits including their abbreviations and units of measurements.

To compensate for possible bias from individual body size, the values obtained from metric measurements were normalized using anatomical reference points within the same radiograph as stated below. The unitless normalized values are indicated by the superscript REL.

$$REL_STEP = STEP/CAN_L7_CD,$$

$$REL_IVS = IVS/CAN_L7_CD,$$

and

$$REL_LX = LX/[(L_L6 + L_L7 + L_S1)/3],$$

$$REL_HX = HX/[(H_L6 + H_L7 + H_S1)/3],$$

$$REL_CAN_X_CR = CAN_X_CR/H_X,$$

$$REL_CAN_Y_CD = CAN_Y_CD/H_X,$$

with

$$X = L6, L7, S1 \text{ and } Y = L6, L7, S3 \text{ respectively.}$$

The lumbosacral ratio (LS_R) was calculated by dividing the vertebral canal height $REL_CAN_L7_CD$ by the vertebral canal height REL_CAN_S1 as in a previous study (Mattoon and Koblik, 1993). The lumbosacral angle was recorded in two different ways. The dorsal lumbosacral angle (LS_A_D) was derived from a line aligned with the dorsal contour of the vertebral body of the lumbar vertebrae 6 and 7 and a line that joined the dorsal contour of the sacral vertebral bodies. The central lumbosacral angle (LS_A_C) was measured between lines intersecting the vertebral bodies of the last lumbar vertebrae and the sacrum centrally. In addition, the intervertebral angle (EP_A) was obtained from the lines being tangential to the opposing lumbosacral vertebral endplates.

Statistical analysis of radiographic traits

The prevalence of the morphological traits among the two groups was calculated. Descriptive statistics were computed for the morphometric traits. In the analysis of variance, both morphologic and morphometric data were analysed for significant differences regarding group, sex, and age. Group (GSD, control group) and sex (male, female) were regarded fixed effects; age at the time of presentation was included as linear covariate. To allow for eventual differences between the groups caused by the varying age at presentation, age within the group was taken into account. Preliminary trials revealed that the effect of sex between the groups was negligible. Thus, the interaction between group and sex was not integrated in the statistical model applied (model 1):

$$y_{ijkm} = \mu + bA_i(Gr_j) + RGr_j + S_k + e_{ijkm}$$

where y_{ijkm} is the morphologic or morphometric trait obtained from the radiographs, μ is the model constant, $A_i(Gr_j)$ is the age within the group in months with the linear regression factor b , RGr_j is the fixed effect of the group (GSD group vs. control group), S_k is the fixed effect of sex, and e_{ijkm} is the random residual error.

When prior testing revealed an influence of the presence of an LTV on a trait, the presence of an LTV was integrated in the model as a fixed effect and the respective model was used for that specific trait (model 2):

$$y_{ijkm} = \mu + bA_i(RGr_j) + RGr_j + G_k + LTV_1 + e_{ijkm}$$

where LTV_1 is the fixed effect of the presence of an LTV.

For the morphologic traits, a GENMOD procedure (Generalized Linear Model) was employed using a binomial distribution function and probit link function. The analysis of variance of the morphometric traits was exhibited using the SAS-procedure General Linear Model (GLM). Results were considered significant at $P < 0.05$. All statistical analyses were performed using a commercial statistical software package (SAS version 9.2, SAS Institute).

Genetic analysis

In a subset of the GSD group, pedigree data archived by the national GSD Kennel Club was available, and for these dogs, analyses of genetic variance components were performed. The morphological and morphometric criteria of these dogs were analysed for a possible partial genetic background. The genetic analysis of the morphological traits was restricted to traits with a proportion $>5\%$. Hence, two of the morphological traits (SPON^{7/1} and SPON^{6/7}) were excluded.

¹ Puech, P., and Bousset, L. See: <<http://www.dicomworks.com/>> – accessed January 2008.

Table 1

Survey of the nine morphological traits evaluated from the radiographs with their abbreviations.

Morphological traits	
Graded in a binary mode as absent or present	
Variable	Abbreviation
Osteochondrosis of the cranial sacral endplate	SOC
Lumbosacral transitional vertebra	LTV
Spondylosis deformans at lumbosacral junction	SPON ^{7/1}
Spondylosis deformans at L6/L7 intervertebral disc space	SPON ^{6/7}
Lumbosacral facet joint arthropathy	ARTH
Sclerosis of the cranial sacral endplate	SCLER
Opacification associated with lumbosacral intervertebral disc space	O-DISC
Opacification associated with vertebral canal at lumbosacral junction	O-CAN
Reduced delineation of the sacral roof	ROOF

Table 2

Survey of the 17 morphometric traits obtained from the radiographs with their abbreviations and units of measurements.

Morphometric traits		
Graded as continuous measurements		
Variable	Abbreviation	Unit
Lumbosacral step formation	STEP	mm
Width of lumbosacral intervertebral disc space	IVS	mm
Vertebral body length of L6	L_L6	mm
Vertebral body length of L7	L_L7	mm
Vertebral body length of S1	L_S1	mm
Vertebral body height of L6	H_L6	mm
Vertebral body height of L7	H_L7	mm
Vertebral body height of S1	H_S1	mm
Height of vertebral canal cranial at L6	CAN_L6 _{CR}	mm
Height of vertebral canal caudal at L6	CAN_L6 _{CD}	mm
Height of vertebral canal cranial at L7	CAN_L7 _{CR}	mm
Height of vertebral canal caudal at L7	CAN_L7 _{CD}	mm
Height of vertebral canal at S1	CAN_S1	mm
Height of vertebral canal at S3	CAN_S3	mm
Dorsal lumbosacral angle	LS_A _D	°
Central lumbosacral angle	LS_A _C	°
Lumbosacral endplate angle	EP_A	°

For seven morphological and 17 morphometric traits, a statistical model was evolved via SAS-procedure GLM, entering age as linear variable and considering sex plus month and quarter of birth as fixed effects. A comparison of models adjusted for the inclusion of the fixed effects using a likelihood ratio test yielded no significant advance for factoring in the month and quarter of birth as compared to the model involving sex as the only fixed effect. This applied for both the morphological and the morphometric traits equally.

The following linear model was therefore adopted for all 24 traits:

$$y_{ijkl} = \mu + bA_i + G_j + a_k + e_{ijkl}$$

where y_{ijkl} is the morphologic or morphometric trait obtained from the radiographs, μ is the model constant, A_i is the age in months with the linear regression factor b , G_j is the sex as fixed effect, a_k is the random additive genetic effect of the animal, and e_{ijkl} the random residual error.

Univariate estimation of genetic parameters was conducted. Accordingly, multivariate estimates were obtained to account for possible correlation existing between the traits.

Restricted maximum likelihood procedures were applied to obtain variance component estimates using dedicated computer software (VCE-5, version 5.1.2 FAL; Mariensee-Neustadt; Kovac et al., 2003). Heritabilities (h^2) and genetic (r_g) and residual correlations (r_e) of two traits each (traits 1 and 2) were calculated based on their estimated additive genetic (σ_a^2 , cov_a) and residual (co)variance (σ_e^2 , cov_e) as follows:

$$h_1^2 = \sigma_{a1}^2 / (\sigma_{a1}^2 + \sigma_{e1}^2) \text{ or } h_2^2 = \sigma_{a2}^2 / (\sigma_{a1}^2 + \sigma_{e1}^2),$$

$$r_{g12} = \text{cov}_{a12} / (\sigma_{a1} * \sigma_{a2}), \text{ and}$$

$$r_{e12} = \text{cov}_{e12} / (\sigma_{e1} * \sigma_{e2}).$$

The implementation of linear models in the analysis of parameters graded in a binary mode (morphologic traits) leads to underestimation of heritabilities and

Table 3

Prevalence of morphological traits reported as number of dogs (%) for the German shepherd dog (GSD) group ($n = 733$) and the control group comprising 334 dogs of 46 breeds.

Variable	GSD group	Control group	P
SOC	74 (10.1)	19 (5.7)	0.013
LTV	50 (6.8)	14 (4.2)	0.270
SPON ^{7/1}	79 (10.8)	74 (22.2)	0.915
SPON ^{6/7}	31 (4.2)	26 (7.8)	0.963
ARTH	168 (22.9)	28 (8.4)	<0.001
SCLER	319 (43.5)	96 (28.7)	<0.001
O-DISC	97 (13.2)	21 (6.3)	<0.001
O-CAN	166 (22.7)	12 (3.6)	<0.001
ROOF	295 (40.3)	145 (43.4)	0.600

A legend to the abbreviations of the variables is provided in Table 1.

$P < 0.05$ considered statistically significant (95% confidence interval).

Table 4

Distribution of the results for the morphometric traits in the German shepherd dog (GSD) group ($n = 733$) and the control group ($n = 334$) quoted as unitless normalized values (indicated by the superscript REL). Data are presented as means (standard deviation). Absolute values are given for the lumbosacral angles with the unit°.

Variable	GSD group	Control group	P
REL ^L STEP	0.26 (0.18)	0.09 (0.15)	<0.001
REL ^L IVS	0.54 (0.14)	0.48 (0.12)	<0.001
REL ^L L_L6	1.19 (0.04)	1.21 (0.04)	<0.001
REL ^L L_L7	1.04 (0.03)	1.03 (0.03)	<0.001
REL ^L L_S1	0.76 (0.04)	0.76 (0.04)	0.374
REL ^L H_L6	0.88 (0.04)	0.92 (0.04)	<0.001
REL ^L H_L7	0.96 (0.03)	0.96 (0.03)	0.092
REL ^L H_S1	1.16 (0.05)	1.12 (0.05)	<0.001
REL ^L CAN_L6 _{CR}	0.66 (0.08)	0.71 (0.10)	<0.001
REL ^L CAN_L6 _{CD}	0.62 (0.09)	0.67 (0.10)	<0.001
REL ^L CAN_L7 _{CR}	0.51 (0.07)	0.60 (0.08)	<0.001
REL ^L CAN_L7 _{CD}	0.50 (0.07)	0.57 (0.08)	<0.001
REL ^L CAN_S1	0.34 (0.05)	0.42 (0.06)	<0.001
REL ^L CAN_S3	0.25 (0.05)	0.31 (0.05)	<0.001
LS_A _D	160.66 (6.10)	157.73 (7.67)	<0.001
LS_A _C	152.99 (7.26)	148.51 (7.22)	<0.001
EP_A	17.10 (5.24)	17.50 (4.44)	0.283

A legend to the abbreviations of the variables is provided in Table 2. The superscript REL is assigned for the variables analysed as unitless normalized values.

$P < 0.05$ considered statistically significant (95% confidence interval).

residual correlations relative to the prevalence of the trait in question. This underestimation can be compensated for via transformation of the estimates based upon the threshold value scheme, which was applied according to Dempster and Lerner (1950) and Vinson et al. (1976). Heritability was transformed according to the following equation:

$$h_{liab}^2 = h_{obs}^2 [p_i(1 - p_i)] / z_i^2$$

where h_{liab}^2 is the heritability of the trait i on the underlying continuous scale, h_{obs}^2 is the heritability of the trait i as recorded from the observed (binary) scale, p_i is the prevalence of the trait 1, and z_i the ordinate of the standard-normal distribution at the threshold that corresponds to p_i .

The transformation of residual correlation between two traits (traits 1 and 2) was obtained as follows:

$$r_{e liab} = r_{e obs} \{ [p_{11}(1 - p_{11}) / z_{11}^2]^{1/2} \} \{ [p_{12}(1 - p_{12}) / z_{12}^2]^{1/2} \}$$

We report below the transformed heritability and residual correlation for all binary (morphologic) traits. As additive genetic correlation estimates are not affected by underestimation, a transformation was unnecessary. The heritability estimates of all traits investigated demonstrated a high level of agreement according to the various multivariate analytic procedures. Therefore, the results presented are confined to the means and standard error.

Results

Descriptive statistics

Seven hundred and thirty-three GSDs met the inclusion criteria (392 males, 341 females). The mean age was 15 months (range, 9–

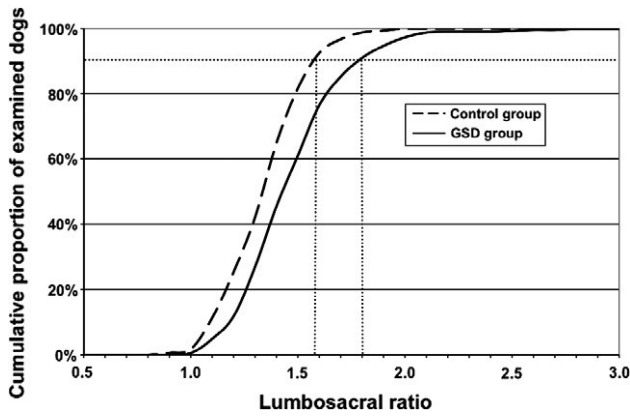


Fig. 1. Proportion of dogs in the German shepherd (GSD) and Control group as a function of their lumbosacral ratio. Dotted lines define the 90%-quantiles, which = 1.80 in the GSD group and 1.60 in the control group. There is a shift in distribution to higher lumbosacral ratios in the GSD group, indicating an acute drop in vertebral canal height between the last lumbar vertebra and the sacrum in the GSDs compared to the control dogs.

145 months) with 90% being <18 months. The control group comprised 334 dogs of 46 breeds. These included: Labrador Retrievers ($n = 49$), Golden Retrievers ($n = 33$), Bernese Mountain dogs

($n = 29$), Boxers ($n = 26$), Rottweilers ($n = 24$), Doberman Pinschers ($n = 23$), Giant Schnauzers ($n = 21$). There were also 129 dogs of 39 other breeds. The control group comprised 190 males and 144 females. The mean age was 29 months (range, 10–94 months). Less than 50% of the control dogs were younger than 18 months.

Results of radiographic evaluation

The prevalence of the morphological traits in GSDs and control dogs is shown in Table 3. SOC lesions were seen in 10.1% of the GSDs and in 5.7% of the controls ($P = 0.013$). We also found a greater proportion of LTV in the GSD group (6.8%) compared to the control group (4.2%) but there was no statistical significance. Differences with a high level of significance ($P < 0.001$) were evident for four of the morphological traits, namely, ARTH, SCLER, O-DISC and O-CAN which each occurred at a higher frequency in the GSD group than in the control group. Only two of the morphological traits were significantly influenced by the sex of the animals ($P < 0.05$): males were more frequently affected by SCLER than females, whereas females had a higher proportion of SPON^{6/7} ($P < 0.05$).

The descriptive statistics of the morphometric lumbosacral traits are listed in Table 4. RELSTEP was significantly more pronounced in the GSD group with a value of 0.26 ± 0.18 vs.

Table 5

Multivariate estimates of heritability (h^2), genetic and residual correlation for the morphological traits of the lumbosacral junction in a subset of 572 German shepherd dogs (GSDs). h^2 estimates are arranged diagonally (bold type), the genetic correlation is quoted above the diagonal, and residual correlation below the diagonal. Standard errors are presented in parentheses below the estimates.

Variable	SOC	LTV	SCLER	ARTH	ROOF	O-DISC	O-CAN
SOC	0.505 (0.128)	-0.215 (0.189)	-0.247 (0.131)	0.084 (0.122)	0.871 (0.090)	-0.173 (0.155)	-0.243 (0.172)
LTV	-0.016 (0.142)	0.639 (0.159)	0.544 (0.148)	0.095 (0.145)	0.053 (0.168)	0.112 (0.177)	0.190 (0.191)
SCLER	0.554 (0.104)	-0.573 (0.133)	0.597 (0.077)	0.839 (0.057)	-0.110 (0.107)	0.800 (0.119)	0.881 (0.086)
ARTH	0.004 (0.107)	0.206 (0.132)	0.213 (0.091)	0.620 (0.114)	0.001 (0.110)	0.919 (0.062)	0.928 (0.061)
ROOF	-0.178 (0.116)	0.143 (0.148)	0.152 (0.088)	0.202 (0.086)	0.619 (0.099)	-0.347 (0.166)	-0.332 (0.149)
O-DISC	0.190 (0.109)	-0.148 (0.133)	-0.065 (0.102)	-0.073 (0.120)	0.296 (0.114)	0.436 (0.104)	0.984 (0.041)
O-CAN	0.392 (0.083)	0.019 (0.105)	0.467 (0.061)	0.715 (0.073)	0.147 (0.079)	-0.044 (0.086)	0.219 (0.054)

A legend to the abbreviations of the variables is provided in Table 1.

Table 6

Multivariate estimates of heritability (h^2), genetic and residual correlation for the morphometric traits of the lumbosacral junction in a subset of 572 German shepherd dogs (GSDs). h^2 estimates are arranged diagonally (bold type), the genetic correlation is quoted above the diagonal and residual correlation below the diagonal. Standard errors are presented in parentheses below the estimates.

Variable	LS _{Ad}	LS _{Ac}	EP _A	STEP	IVS
LS _{Ad}	0.768 (0.079)	0.865 (0.021)	-0.840 (0.036)	-0.045 (0.115)	-0.572 (0.070)
LS _{Ac}	0.672 (0.085)	0.759 (0.058)	-0.821 (0.034)	0.299 (0.110)	-0.165 (0.085)
EP _A	0.168 (0.221)	0.084 (0.179)	0.754 (0.052)	0.070 (0.100)	0.442 (0.097)
STEP	-0.332 (0.138)	-0.385 (0.119)	0.257 (0.103)	0.338 (0.062)	0.473 (0.149)
IVS	0.305 (0.087)	0.278 (0.068)	-0.292 (0.094)	0.197 (0.070)	0.250 (0.064)

	L _{L6}	L _{L7}	L _{S1}	H _{L6}	H _{L7}	H _{S1}
L _{L6}	0.431 (0.087)	-0.501 (0.163)	-0.849 (0.047)	-0.139 (0.238)	0.269 (0.360)	0.043 (0.272)
L _{L7}	-0.042 (0.093)	0.266 (0.074)	-0.031 (0.192)	-0.146 (0.216)	-1.000 (0.362)	0.250 (n.a.)
L _{S1}	-0.1787 (0.029)	-0.3583 (0.060)	0.270 (0.081)	0.258 (0.240)	0.243 (0.540)	-0.355 (0.352)
H _{L6}	0.300 (0.086)	-0.320 (0.063)	-0.053 (0.073)	0.225 (0.081)	-0.141 (0.419)	0.924 (0.074)
H _{L7}	0.231 (0.073)	-0.029 (n.a.)	-0.173 (0.066)	0.014 (0.063)	0.052 (0.048)	-0.249 (0.430)
H _{S1}	-0.374 (0.072)	0.281 (0.060)	0.148 (0.072)	-0.751 (0.028)	-0.670 (0.034)	0.136 (0.067)

	CAN _{L6CR}	CAN _{L6CD}	CAN _{L7CR}	CAN _{L7CD}	CAN _{S1}	CAN _{S3}
CAN _{L6CR}	0.665 (0.056)	0.661 (0.037)	0.798 (0.052)	0.455 (0.074)	0.345 (0.098)	0.295 (0.072)
CAN _{L6CD}	0.641 (0.067)	0.730 (0.047)	0.516 (0.050)	0.467 (0.066)	-0.121 (0.080)	-0.217 (0.059)
CAN _{L7CR}	0.307 (0.101)	0.476 (0.073)	0.574 (0.048)	0.675 (0.038)	0.744 (0.052)	0.666 (0.048)
CAN _{L7CD}	0.406 (0.086)	0.475 (0.080)	0.535 (0.043)	0.494 (0.045)	0.266 (0.086)	0.265 (0.071)
CAN _{S1}	0.129 (0.078)	0.431 (0.071)	0.070 (0.055)	0.470 (0.051)	0.308 (0.049)	0.954 (0.026)
CAN _{S3}	-0.047 (0.134)	0.453 (0.098)	-0.258 (0.100)	0.282 (0.089)	0.236 (0.062)	0.722 (0.037)

A legend to the abbreviations of the variables is provided in Table 2.

n.a., not applicable.

0.09 ± 0.15 in the control group ($P < 0.001$). Moreover, an absolute measurement for STEP > 0 was noted at a ratio of 2:1 in the GSDs compared with the control dogs. ^{REL}IVS was significantly larger in the GSD group (0.54 ± 0.14) than in the control dogs (0.48 ± 0.12). Regarding the dimensions of the vertebral bodies, the significant differences ($P < 0.001$) included a shorter ^{REL}L_L6, a longer ^{REL}L_L7, a lower ^{REL}H_L6, and a higher ^{REL}H_S1. Furthermore, differences with a high level of significance ($P < 0.001$) were observed for the dorsoventral dimension of the vertebral canal in general.

At any of the six points measured, the height of the vertebral canal was reduced in the GSDs. The LS_R was significantly higher for the GSDs (1.51 ± 0.31) compared to the control dogs (1.38 ± 0.19, $P < 0.001$), indicating a greater degree of reduction of spinal canal height at the level of the LSJ. Fig. 1 demonstrates the distribution of the lumbosacral ratio (LS_R) between the GSD and the control groups. Regardless of which method was used to obtain the measurements, the lumbosacral angles (LS_A_D and LS_A_C) were significantly higher for the GSDs ($P < 0.001$).

Results of genetic analysis

Pedigree data were available in a subset of 572 GSDs. The records represented 298 males and 274 females. The mean litter size was 1.93 for the sires and 1.35 for the dams. Table 5 contains multivariate estimates of heritability (h^2), genetic correlation (r_g), and residual correlation (r_r) of the morphologic traits of the LSJ. The heritability estimates for the morphologic traits ranged from 0.22 to 0.64. Negative genetic correlations < -0.2 were estimated for SOC with LTV; SCLER; and O-CAN, ROOF with O-DISC, and ROOF with O-CAN. Moderate to high positive genetic correlations (>0.5) were calculated for SOC with ROOF, LTV with SCLER, SCLER with ARTH; O-DISC; and O-CAN, ARTH with O-DISC and O-CAN, and O-DISC with O-CAN.

The variance component estimates of the morphometric traits of the LSJ of the GSDs are illustrated in Table 6. Low-to-moderate heritabilities were estimated for IVS ($h^2 = 0.25$) and STEP ($h^2 = 0.34$). In the domain of the normalized vertebral body measurements, multivariate analysis revealed low-to-moderately high heritabilities ($h^2 = 0.05$ –0.43). Among the six reference points for the lumbosacral vertebral canal height, moderate-to-high heritabilities ranging from 0.31 to 0.72 were detected. The vertebral canal measurements proved to be predominantly positively correlated with $r_g \geq 0.3$. In particular, for CAN_S1 and CAN_S3 a close positive genetic correlation ($r_g = 0.95$) was estimated.

Discussion

Our findings indicate that there is variation in skeletal morphology and morphometry of the LSJ in GSDs compared with dogs of similar size. The percentage of SOC in the GSD group was approximately twice the percentage of the control group (10.1% and 5.7%, respectively). As SOC has been reported to disrupt the integrity of the lumbosacral intervertebral disc, it is regarded as a promoter of lumbosacral stenosis and CES (Lang et al., 1992; Hanna, 2001; Glyde et al., 2004; Michal et al., 2004; Mathis et al., 2009). Considering the frequent occurrence of this finding in GSDs, SOC may be a factor exposing particularly this breed to lumbosacral disease.

The prevalence of an LTV separated from the fused sacral segments by a rudimentary intervertebral space was greater in the GSD group (6.8%) than in the controls (4.2%), although this difference was not statistically significant. A significantly higher prevalence of LTV in GSDs than in other breeds has been reported by others (Winkler and Loeffler, 1986; Morgan et al., 1993; Breit and Künzel, 1998; Morgan, 1999; Breit et al., 2003; Damur Djuric

et al., 2006; Flückiger et al., 2006), but was not apparent in our study. Our results would suggest that this disorder is not a major contributor to the frequent occurrence of lumbosacral stenosis and CES in the GSDs.

The analysis of the morphometric data highlights the differences in skeletal morphology between GSD and other large breeds of dogs. The reduced vertebral canal height throughout the entire length of the lumbosacral transition, when compared with other breeds, suggests the presence of lumbosacral stenosis existing presumably as a primary malformation in the GSD. The confined LSJ noted in the GSD is further supplemented by the significantly increased LS_R, which indicates an abrupt drop in the dorsoventral lumbosacral vertebral canal height between the last lumbar vertebra and the sacrum.

In our study sample, significantly larger STEPs were found in the GSDs. Furthermore, and regardless of their metric extent, STEPs were twice as frequent in the GSD group as in the control group. Despite disagreement on the metric extent of lumbosacral step formations necessary to cause clinical disease, i.e., >4 mm (Schmid and Lang, 1993) or as small as 2 mm (Suwankong et al., 2006), this finding is generally considered to be important in promoting lumbosacral disease (Schmid and Lang, 1993; Suwankong et al., 2006).

The significant differences in lumbosacral vertebral canal height, LS_R and STEP characterize the aberrant morphometry of the LSJ in the GSD. Given that we focused on young dogs without signs of lumbosacral disease, these findings suggest that the changes are of primary origin. It is known from human medicine that most of the congenital conditions compromising the spinal canal do not manifest until traumatic or degenerative processes ensue (Kirkaldy-Willis et al., 1974; Verbiest, 1975; Munday et al., 1994).

In veterinary medicine, it has been proposed that the combination of congenital lumbosacral stenosis and degenerative changes may cause cauda equina compression in large breed dogs (Oliver et al., 1978; Tarvin and Prata, 1980; Palmer and Chambers, 1991; Bailey and Morgan, 1992; Jones et al., 1996). Due to the reduced spatial tolerance towards secondary degenerative or hypertrophic changes in the LSJ, we assume that the risk of developing clinically relevant stenosis is increased in animals with a narrow lumbosacral vertebral canal or other anomalies such as ^{REL}STEP (as we have specifically identified in GSDs). With regard to the confined LSJ in GSDs, the morphological disorders SOC and premature degeneration are of special interest.

Previous work has documented the prevalence of LTV to be as high as 29% in some populations of GSDs (Larsen, 1977; Winkler and Loeffler, 1986; Morgan et al., 1993; Damur Djuric et al., 2006; Flückiger et al., 2006; Wigger et al., 2009). The discrepancy between the prevalence of LTV recorded in our study and in previous work may reflect natural fluctuations through unequal study populations and age groups and, in particular, the difference in inclusion criteria. Studies reporting higher percentages of LTV provide for different types of LTV. Isolation of the 'spinous process type' vertebrae account for approximately 80% of LTV (Wigger et al., 2009), but were disregarded in our study because based on our experience and that of others (Flückiger et al., 2009) they are inconsistently identified radiographically, and also as these forms of LTV can be considered insignificant in the individual dog (Flückiger et al., 2009).

It has been postulated that abnormal biomechanics associated with a translational motion type and/or altered range of motion is the most significant aspect of LTV with regard to early disc degeneration and CES (Bürger and Lang, 1992; Morgan et al., 2000; Luoma et al., 2004; Flückiger et al., 2006). To date, no study has documented the actual change in kinetics with a transitional vertebra, and an alteration in lumbosacral mobility seems to apply only to complete isolation of the abnormal vertebral segment from the fused sacral vertebrae.

Heritability conveys the proportion of the total phenotypic variance that is attributed to genetic factors and heritability estimates give a measure of the relative importance of genetic variance in determining the phenotypic variance of a specific trait (Conner and Hartl, 2004). If the heritability of a trait is between 0.4 and 1.0, it is generally considered high and the phenotype is a good predictor of the genetic disposition of an animal. With high heritability estimates, beneficial results might be expected by phenotypic selection for or against any trait.

Genetic correlations between traits are of substantial interest, because depending on their value (positive or negative) and the desired breeding objective regarding the individual trait, they can either facilitate or hamper phenotypic selection of the traits. Genetic correlations may produce beneficial or undesirable changes in selection programs. Undesirable correlations have to be known and must not be ignored in meeting breeding objectives as they may influence the rate of progress.

With regard to the morphological and morphometric traits that presumably advance the susceptibility of GSD to lumbosacral disease, the results of our genetic analysis indicate that a relevant proportion of the phenotypic variance of these traits is determined by genetic factors. Heritability estimates for SOC and LTV were high (>0.5) although a low negative correlation was calculated between SOC and LTV. Fortunately, within that range, minimal (if any) effect of the traits on each other would be expected and the selection of one of these traits should not impede selection of the other significantly.

The heritability estimates of the relevant morphometric traits, including STEP and lumbosacral vertebral canal height, were moderate to high. Furthermore, a distinctive positive correlation ($r_g = 0.95$) was noted at the crucial site of spinal canal narrowing between the caudal endplate of L7 and the cranial endplate of the sacrum creating favourable conditions for breeding selection. Due to the relatively limited sample size of animals studied in the genetic analysis, the definite values estimated have to be interpreted with some caution, and a re-evaluation with adjustment of the population size may be beneficial (Klein, 1974). Nevertheless, there are non-zero heritabilities of relevant morphological and morphometric lumbosacral features in the GSD. Our results not only demonstrate that genetic effects contribute to the phenotypic variance of the LSJ in GSDs, but also provide efficacy for selective breeding against factors potentially associated with lumbosacral disease.

The limitations of the study are mainly attributable to its retrospective nature which may have introduced confounding factors regarding the selection of the study population and the retrospective matching process of the control dogs to the GSDs. The even distribution of physical characteristics between the GSD and the control groups may have been limited by this procedure so a generalization of the results may not be wholly applicable. The analysis of the genetic variance components makes use of a subpopulation of GSDs from the GSD group. In addition, the relatively small sample size and deviating population structure (owing to different ancestry) represent a potential source of bias, particularly in comparison with other populations.

The appearance of acquired lumbosacral features may have been influenced by the disparity in age between the GSDs and the dogs in the control group. However, despite the distinctively lower age of the GSDs compared with the controls, the prevalence of acquired traits such as ARTH, SCLER, and both O-DISC and O-CAN, was greater in the GSD. Thus, although a general distortion of the results by age differences may exist, it should not have led to overestimation of findings in the GSD group. This finding rather suggests premature onset of and/or general disposition towards degeneration of lumbosacral segments specifically in this breed.

Conclusions

An aberrant skeletal conformation of the LSJ was found in GSDs with morphological and morphometric findings when compared with other large breed dogs. The findings suggest the presence of a primary lumbosacral stenosis in GSDs that has not been documented before. Various features that predispose to lumbosacral disease are greater in frequency or magnitude in GSDs, such as SOC, early onset of degenerative changes, and STEP of the LSJ. In addition, relevant proportions of the phenotypic variance of most of the promoting phenotypic features, including SOC, LTV, STEP and lumbosacral stenosis, are determined by genotypic variance. Selection against these factors appears to be feasible and is suggested.

Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organisations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

References

- Bailey, C.S., Morgan, J.P., 1992. Congenital spinal malformations. *Veterinary Clinics of North America* 22, 985–1015.
- Breit, S., Knaus, I., Künzel, W., 2003. Differentiation between lumbosacral transitional vertebrae, pseudolumbarisation, and lumbosacral osteophyte formation in ventrodorsal radiographs of the canine pelvis. *The Veterinary Journal* 165, 36–42.
- Breit, S., Künzel, W., 1998. Osteologische Besonderheiten an Wirbelsäulen von Rassehunden: Eine röntgenologische und morphologische Studie. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 85, 340–350.
- Bürger, R., Lang, J., 1992. Kinetische Studie über die Lendenwirbelsäule und den lumbosakralen Übergang beim Deutschen Schäferhund. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 134, 411–416.
- Conner, J.K., Hartl, D.L., 2004. *A Primer of Ecological Genetics*. Sinauer Associates Inc., Massachusetts, USA.
- Damur Djuric, N., Steffen, F., Hässig, M., Morgan, J.P., Flückiger, M.A., 2006. Lumbosacral transitional vertebrae in dogs: Classification, prevalence, and association with sacroiliac morphology. *Veterinary Radiology and Ultrasound* 47, 32–38.
- Danielsson, F., Sjöström, L., 1999. Surgical treatment of degenerative lumbosacral stenosis in dogs. *Veterinary Surgery* 28, 91–98.
- Dempster, E.R., Lerner, I.M., 1950. Heritability of threshold characters. *Genetics* 35, 212–235.
- DeRisió, L., Thomas, W.B., Sharp, N.J.H., 2000. Degenerative lumbosacral stenosis. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice* 30, 111–132.
- Feeney, D.A., Wise, M., 1981. Epidurography in the normal dog: Technique and radiographic findings. *Veterinary Radiology* 22, 35–39.
- Flückiger, M.A., Damur-Druric, N., Hässig, M., Morgan, J.P., Steffen, F., 2006. A lumbosacral transitional vertebra in the dog predisposes to cauda equina syndrome. *Veterinary Radiology and Ultrasound* 47, 39–44.
- Flückiger, M.A., Geissbühler, U., Lang, J., 2009. Lumbosakrale Übergangswirbel: Welche Bedeutung haben sie für die Gesundheit von betroffenen Hunden? *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 3, 133–135.
- Glyde, M., Doyle, H., McAllister, H., Campoy, L., Callanan, J.J., 2004. Magnetic resonance imaging in the diagnosis and surgical management of sacral osteochondrosis in a mastiff dog. *Veterinary Record* 155, 83–86.
- Hanna, F.Y., 2001. Lumbosacral osteochondrosis: Radiological features and surgical management in 34 dogs. *Journal of Small Animal Practice* 42, 272–278.
- Indrieri, R.J., 1988. Lumbosacral stenosis and injury of the cauda equina. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice* 18, 697–710.
- Jones, J.C., Sorjonen, D.C., Simpson, S.T., Coates, J.R., Lenz, S.D., Hathcock, J.T., Agee, M.W., Bartels, J.E., 1996. Comparison between computed tomography and surgical findings in nine large-breed dogs with lumbosacral stenosis. *Veterinary Radiology and Ultrasound* 37, 247–256.
- Kirkaldy-Willis, W.H., Paine, K.W.L., Cauchoix, J., McIvor, G., 1974. Lumbar spinal stenosis. *Clinical Orthopaedics* 99, 30–49.
- Klein, T.W., 1974. Heritability and genetic correlation: Statistical power, population comparisons, and sample size. *Behavioral Genetics* 3, 355–364.
- Kovac, M., Groenenveld, E., Garcia-Cortez, A., 2003. *VCE-5 Users Guide and Reference Manual Version 5.1.2*. Institut für Tierzucht und Tierverhalten, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Mariensee/Neustadt.
- Lang, J., Häni, H., Schawwalder, P., 1992. A sacral lesion resembling osteochondrosis in the German shepherd dog. *Veterinary Radiology and Ultrasound* 33, 69–76.
- Larsen, J.S., 1977. Lumbosacral transitional vertebrae in the dog. *Journal of the American Veterinary Radiology Society* 18, 76–79.

- Luoma, K., Vehmas, T., Raininko, R., Luukkonen, R., Riihimäki, H., 2004. Lumbosacral transitional vertebra: Relation to disc degeneration and low back pain. *Spine* 29, 200–205.
- Mathis, K., Havlicek, M., Beck, J., Eaton-Wells, R.D., Park, F.M., 2009. Sacral osteochondrosis in two German shepherd dogs. *Australian Veterinary Journal* 87, 249–252.
- Mattoon, J.S., Koblik, P.D., 1993. Quantitative survey radiographic evaluation of the lumbosacral spine of normal dogs and dogs with degenerative lumbosacral stenosis. *Veterinary Radiology and Ultrasound* 34, 194–206.
- Meij, B.P., Bergknut, N., 2010. Degenerative lumbosacral stenosis in dogs. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice* 40, 983–1009.
- Michal, U., Steffen, F., Hauser, B., Damur, D., Philipp, M., 2004. Sacral osteochondrosis dissecans in a Bernese Mountain dog: Diagnosis and treatment. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 146, 233–238.
- Morgan, J.P., 1993. *Techniques of Veterinary Radiography*, Fifth Ed. Iowa State University Press.
- Morgan, J.P., 1999. Transitional lumbosacral vertebral anomaly in the dog: A radiographic study. *Journal of Small Animal Practice* 40, 167–172.
- Morgan, J.P., Bahr, A., Franti, C.E., Bailey, C.S., 1993. Lumbosacral transitional vertebrae as a predisposing cause of cauda equina syndrome in German shepherd dogs: 161 cases (1987–1990). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 202, 1877–1882.
- Morgan, J.P., Wind, A., Davidson, A.P., 2000. Transitional lumbosacral vertebrae. In: Morgan, J.P., Wind, A., Davidson, A.P. (Eds.), *Hereditary Bone and Joint Diseases in the Dog*. Schlütersche, Hannover, Germany, pp. 223–229.
- Morgan, J.P., Bailey, C.S., 1990. Cauda equina syndrome in the dog: Radiographic evaluation. *Journal of Small Animal Practice* 31, 69–77.
- Munday, T.L., Johnson, M.H., Hayes, C.W., Thompson, E.O., Smoker, W.R.K., 1994. Musculoskeletal causes of spinal axis compromise: Beyond the usual suspects. *RadioGraphics* 14, 1225–1245.
- Ness, M.G., 1994. Degenerative lumbosacral stenosis in the dog: A review of 30 cases. *Journal of Small Animal Practice* 35, 185–190.
- Oliver, J.R., Selcer, R.R., Simpson, S., 1978. Cauda equina compression from lumbosacral malarticulation malformation in the dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 17, 207–214.
- Palmer, P.H., Chambers, J.N., 1991. Canine lumbosacral diseases. Part I. Anatomy, pathophysiology, and clinical presentation. *Compendium on Continuing Education* 13, 61–69.
- Rossi, F., Seiler, G., Busato, A., Wacker, C., Lang, J., 2004. Magnetic resonance imaging of articular process joint geometry and intervertebral disk degeneration in the caudal lumbar spine (L5–S1) of dogs with clinical signs of cauda equina compression. *Veterinary Radiology and Ultrasound* 45, 381–387.
- Scharf, G., Steffen, F., Grünenfelder, F., Morgan, J.P., Flückiger, M., 2004. The lumbosacral junction in working German Shepherd Dogs: Neurological and radiological evaluation. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 51, 27–32.
- Schmid, V., Lang, J., 1993. Measurements on the lumbosacral junction in normal dogs and those with cauda-equina compression. *Journal of Small Animal Practice* 34, 437–442.
- Seiler, G.S., Häni, H., Busato, A.R., Lang, J., 2002. Facet joint geometry and intervertebral disk degeneration in the L5–S1 region of the vertebral column in German Shepherd Dogs. *American Journal of Veterinary Research* 63, 86–90.
- Steffen, F., Hunold, K., Scharf, G., Roos, M., Flückiger, M., 2007. A follow-up study of neurological and radiographic findings in working German shepherd dogs with and without degenerative lumbosacral stenosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 231, 1259–1533.
- Suwankong, N., Voorhout, G., Hazewinkel, H.A.W., Meij, B.P., 2006. Agreement between computed tomography, magnetic resonance imaging, and surgical findings in dogs with degenerative lumbosacral stenosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 229, 1924–1929.
- Suwankong, N., Meij, B.P., Voorhout, G., 2008. Review and retrospective analysis of degenerative lumbosacral stenosis in 156 dogs treated by dorsal laminectomy. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* 21, 285–293.
- Tarvin, G., Prata, R.G., 1980. Lumbosacral stenosis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 177, 154–159.
- Verbiest, H., 1975. Pathomorphologic aspects of developmental lumbar stenosis. *Orthopedic Clinics of North America* 6, 177–196.
- Vinson, W.E., White, J.M., Kliewer, R.H., 1976. Overall classification as a selection criterion for improving categorically scored components of type in Holsteins. *Journal of Dairy Science* 59, 2104–2114.
- Walla, L., 1986. Die Kompression der Cauda equina beim Hund. *Kleintierpraxis* 31, 315–322.
- Watt, P.R., 1991. Degenerative lumbosacral stenosis in 18 dogs. *Journal of Small Animal Practice* 32, 125–134.
- Wigger, A., Julier-Franz, C., Tellhelm, B., Kramer, M., 2009. Lumbosacral transitional vertebrae in the German shepherd dog: Prevalence, classification, genetics, and association with canine hip dysplasia. *Tierärztliche Praxis Ausgabe Kleintiere Heimtiere* 37, 7–13.
- Winkler, W., Loeffler, K., 1986. Lumbosakrale Übergangswirbel beim Hund. *Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift* 99, 343–346.
- Wright, J.A., 1980. Spondylosis deformans of the lumbo-sacral joint in dogs. *Journal of Small Animal Practice* 21, 45–58.

Verlaufsuntersuchung der lumbalen Bandscheiben- und Facettengelenkveränderungen bei 5 Deutschen Schäferhunden

Long-term examinations of the lumbar disc and facet joint changes in 5 German Shepard dogs

Autorinnen/Autoren

Christiane Paulus¹, Hannah Sofie Brinkmeier¹, Rodja Aljoscha Jähig¹, Katharina Isabell Schaub¹, Kathrin Büttner², Martin Kramer¹, Kerstin von Pückler¹

Institute

- 1 Klinik für Kleintiere – Chirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen
- 2 AG Biomathematik und Datenverarbeitung der Justus-Liebig-Universität Gießen

Schlüsselwörter

Hund, Facettengelenk, Lendenwirbelsäule, Bandscheibensignalintensität

Key words

Canine, facet joints, lumbar spine, disc signal intensity

eingereicht 03.04.2022

akzeptiert 05.08.2022

Bibliografie

Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere 2022; 50: 400–410

DOI 10.1055/a-1967-9782

ISSN 1434–1239

© 2022. Thieme. All rights reserved.

Georg Thieme Verlag KG, Rüdigerstraße 14,
70469 Stuttgart, Germany

Korrespondenzadresse

Christiane Paulus
Klinik für Kleintiere – Chirurgie
Justus-Liebig-Universität
Frankfurter Straße 114
35392 Gießen
Deutschland
Christiane.Thumm@vetmed.uni-giessen.de

ZUSAMMENFASSUNG

Gegenstand und Ziel In dieser Langzeitbeobachtungsstudie sollten erstmals die Veränderungen der kaudalen Lendenwirbelsäule an den Lokalisationen L5/6, L6/7 und L7/S1 bei 5 Deutschen Schäferhunden im Abstand von 6 Jahren mithilfe der Computertomografie (CT) und Magnetresonanztomografie (MRT) evaluiert werden. Die Hunde waren zum Zeitpunkt der ersten Untersuchung im Mittel 26 Monate alt. Zudem wurde evaluiert, ob eine Zuchtuntersuchung im Hinblick auf eine Bandscheibendegeneration beim Junghund zielführend ist.

Material und Methoden Die Bandscheiben von L7/S1, L6/7 und L5/6 wurden im Hinblick auf ihre Signalintensitätsveränderung, die Facettengelenkwinkelveränderungen in dorsaler und transversaler Schnittebene sowie die Veränderungen der Bandscheibenfläche in sagittaler und transversaler Rekonstruktionsebene im Jahr 2015 und 2021 mittels CT und MRT genauer untersucht. Alle Daten wurden computergestützt erhoben und statistisch ausgewertet und anschließend mit der gemessenen Signalintensität sowie mit der in der Praxis verwendeten, subjektiven Bandscheibendegenerationseinteilungen nach Seiler verglichen.

Ergebnisse Es zeigte sich ein signifikanter Verlust der gemessenen Signalintensität der Bandscheiben in der transversalen Schnittebene sowie insgesamt eine Facettengelenkerweiterung in der transversalen Ebene von 0,54° sowie in der dorsalen Ebene von 1,8° im Zeitraum von 6 Jahren. Des Weiteren ergaben sich keine Hinweise auf einem Zusammenhang zwischen der Größe des Facettengelenkwinkels und dem Bandscheibendegenerationsgrad. Darüber hinaus wiesen die Bandscheiben unabhängig vom initialen Degenerationsgrad in der Verlaufskontrolle eine geringe Signalintensität und einen höheren Seiler Grad auf.

Schlussfolgerung und klinische Relevanz Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungsgruppe weisen darauf hin, dass ein unauffälliger Zustand der lumbalen Bandscheiben zum Zeitpunkt der Zuchtuntersuchung im Junghundehalter keine genaue Voraussage über den späteren Degenerationsgrad zulässt und es auch bei gesunden Deutschen Schäferhunden an den Facettengelenken zu fortwährenden Umbauprozessen kommt.

ABSTRACT

Object and Purpose The purpose of this first-time long-term observational study was to evaluate the changes of the caudal lumbar spine at the locations L5/6, L6/7, and L7/S1 in 5 German shepherd dogs over a 6-year time period using computed tomography (CT) and magnetic resonance imaging (MRI). The dogs had a mean age of 26 months at the time of the first examination. In addition, it was evaluated whether a breeding examination, with regard to disc degeneration, is justified in young dog.

Material and Methods The locations L7/S1, L6/7, and L5/6 were examined in more detail with regard to their signal

intensity changes, the facet joint angle changes in dorsal (dors) and transverse (trans) planes, and disc surface changes in sagittal (sag) and transverse (trans) reconstruction planes with CT and MRT in 2015 and 2021. All data were collected computer-based and analyzed statistically. Subsequently, the results were compared to the measured signal intensity and to the subjective disc degeneration grading according to Seiler used in practice.

Results Over the period of 6 years a significant loss of the measured signal intensity of the intervertebral discs in the transverse plane and an overall facet joint widening in the transverse plane of 0.54° as well as in the dorsal plane of 1.8° was evident.

In addition, there was no evidence of a relationship between the size of the facet joint angle and the degree of disc degeneration. Furthermore, regardless of the initial degree of degeneration, the discs showed low signal intensity and higher Seiler grade during follow-up.

Conclusion and Clinical Relevance The results of the present study group indicate that an inconspicuous condition of the lumbar intervertebral discs at the time of the initial breeding examination in the young dog does not allow an accurate prediction of the subsequent degree of degeneration and that there are ongoing remodeling processes at the facet joints even in healthy German shepherd dogs.

Einleitung

Eine Bandscheibendegeneration der kaudalen Lendenwirbelsäule kann zu einer degenerativen lumbosakralen Stenose (DLSS) führen [1][2], welche wiederum eine Ursache für das Cauda equina-Kompressionssyndrom darstellen kann [3]. Die Bandscheibendegeneration wird als eine „abnorme, zellvermittelte Reaktion auf ein fortschreitendes strukturelles Versagen“ definiert [2] und wird sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin beschrieben [2][4][5]. Bei der degenerativen lumbosakralen Stenose des Hundes kommt es im Rahmen chronisch degenerativer Veränderungen zu einer Vorwölbung der Bandscheibe mit Einengung des Spinalkanals und der Neuroforamina aufgrund knöcherner oder weichteilgewebiger Proliferation, welche wiederum zu einer Kompression der Cauda equina-Fasern und deren begleitende Blutgefäße führen kann. Die lumbosakrale Bandscheibe spielt bei dieser Erkrankung eine zentrale Rolle [6].

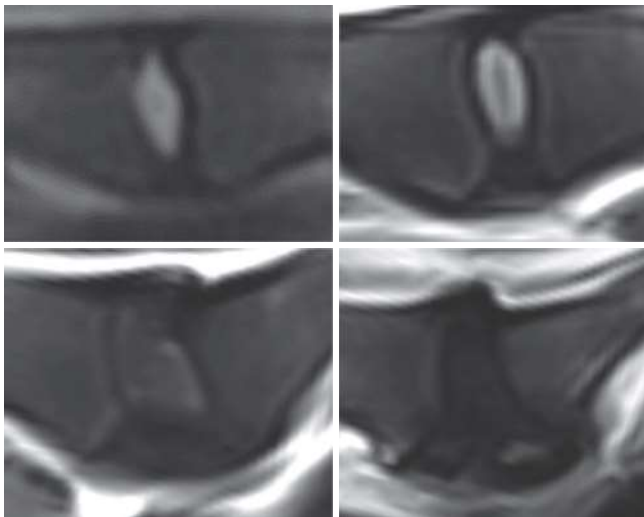
Die degenerative lumbosakrale Stenose ist beim Deutschen Schäferhund die am häufigsten auftretende Erkrankung des lumbosakralen Übergangs [7]. Nach Seiler et al. [8] sind 95% der lumbosakralen Bandscheiben beim Deutschen Schäferhund degenerativ verändert. Hierbei liegt das Alter der untersuchten Hunde zwischen 10 Monaten und 8 Jahren [8]. Das gehäufte Auftreten von lumbosakralen Bandscheibendegenerationen beim Deutschen Schäferhund wird in mehreren Studien näher untersucht [9][10][11][12][13][14][15]. Dabei weisen die Facettengelenke des Deutschen Schäferhundes einen signifikant kleineren Winkel in der Transversalebene und somit eine steilere lumbosakrale Facettengelenkstellung zwischen L5 und S1 auf [8][14]. Des Weiteren beschreiben Breit und Künzel [16] beim Deutschen Schäferhund eine „ineffektive lumbosakrale Facettengelenkgeometrie“. Aufgrund dessen ist anzunehmen, dass die Facettengelenke beim Deutschen Schäferhund die auftretenden Kompressionskräfte nur eingeschränkt reduzieren können [17], was zu einer erhöhten Belastung der Bandscheibe führt [13].

Des Weiteren kommt es bei Hunden aufgrund einer Umformung der Facettengelenke zu einer signifikanten Vergrößerung des Facettengelenkwinkels mit steigendem Alter. Die Vergrößerung des Facettengelenkwinkels nimmt pro Lebensjahr nach Benninger et al. [14] um $0,42^\circ$ in der transversalen Ebene zu. Im Gegensatz dazu kommt es in der dorsalen Ebene zu einer Vergrößerung des Facettengelenkwinkels um $0,44^\circ$ [14]. Zudem zeigen Benninger et al. [18], dass die Bewegungen der lumbalen Wirbelsäule in allen

3 möglichen Bewegungsrichtungen (x-, y-, z- Achse) beim Deutschen Schäferhund signifikant kleiner sind als bei anderen Hunderassen und Mischlingen mit vergleichbarer Statur und vergleichbarem Körpergewicht [18].

Um den komplexen 3-dimensionalen Vorgang der Bewegung darzustellen, untersucht Schaub et al. [13] 4 gesunde Deutsche Schäferhunde mittels CT, MRT und Scientific rotoscoping. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sprechen dafür, dass die lumbosakrale Bandscheibe des Deutschen Schäferhundes besonders im Trab einer erhöhten Belastung ausgesetzt ist. In einer menschlichen Kadaverstudie [2] konnte gezeigt werden, dass hauptsächlich Belastungen aus kombinierten Bewegungen, wie Biegung und Kompression, in Bandscheibenvorfällen resultieren.

Die Referenzmethode zur Bestimmung der Bandscheibendegeneration ist die Histopathologie. Der Vergleich zwischen der Histopathologie und der MRT zeigt, dass Bandscheibendegenerationen in der MRT-Untersuchung bei Hunden mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 79% erkannt werden [19]. Hierfür eignen sich besonders T2-gewichtete Sequenzen [20]. Um den Verlauf der Bandscheibendegeneration in ihrem Alterungsprozess verfolgen zu können, existieren für MRT-Untersuchungen 2 Möglichkeiten. Die subjektive, visuelle Methode [19] sowie Ansätze einer digital-gestützten Methode [12][21][22]. Die morphologische Einteilung der Schwere der Bandscheibendegeneration wird von mehreren Autoren beschrieben [19][20][23]. Nach Seiler et al. [19] werden 4 Grade unterschieden (► **Abb. 1**), wohingegen nach Adams et al. [20] 5 Grade der Bandscheibendegeneration unterschieden werden. Da die Einteilung nach Adams et al. [20] bislang auf die Humanmedizin beschränkt ist, wird für die vorliegende Untersuchung die Graduierung nach Seiler et al. [19] gewählt. Die Signalintensität der Bandscheiben kann in der MRT semiquantitativ mit Hilfe einer sog. „Region of interest“ (ROI) bestimmt werden. Im Vergleich zu einer rein subjektiven Graduierungsmethode bietet diese Messung den Vorteil einer hohen Reproduzierbarkeit [22]. Amort et al. [12] wenden in ihrer Studie ein ROI-gestütztes Messverfahren der Signalintensität an den lumbalen Bandscheiben an und zeigen, dass sich bei fortschreitender Bandscheibendegeneration die messbare Signalintensität der Bandscheiben in unterschiedlichem Maß reduziert und teilweise bis hin zum vollständigen Signalverlust voranschreitet.



► **Abb. 1** Einteilung des Bandscheibendegenerationsgrades nach Seiler et al. [19]: T2 gewichteter Sagittalschnitt lumbaler Bandscheiben mit einem Seiler Grad 1 (oben links), Grad 2 (oben rechts), Grad 3 (unten links) und Grad 4 (unten rechts). Quelle: Klinik für Kleintiere - Chirurgie, Justus-Liebig-Universität Gießen, basierend auf Schmidt et al. [24].

► **Fig. 1** Disc degeneration grade classification according to Seiler et al. [19]: T2 weighted sagittal section of lumbar discs with a Seiler grade 1 (top left), grade 2 (top right), grade 3 (bottom left) and grade 4 (bottom right). Source: Small Animal Clinic - Surgery, Justus-Liebig-University, Giessen, based on Schmidt et al. [24].

Ziel der vorliegenden Studie ist der Vergleich der Facettengelenkmorphologie von L5/6, L6/7 und L7/S1 in einer Gruppe von 5 Deutschen Schäferhunden sowie die Bestimmung der Bandscheibendegeneration anhand der subjektiven Methode nach Seiler et al. [19] und einer objektivierten Methode.

Material und Methoden

Eine 2015 durchgeführte computertomografische Untersuchungen der Lendenwirbelsäule beim Deutschen Schäferhund ist an einem Computertomografen mit 16 Zeilen (Brilliance 16 Philips/Niederlande: 120 kV, 20 mAs, Schichtdicke 1 mm, hoch- und niederfrequenter Rekonstruktions-Algorithmus) sowie die magnetresonanztomografische Untersuchung an einem 1,0 Tesla Hochfeld-System (Intera von Philips, Deutschland; Syn Spine Spule) umgesetzt worden. Die MRT-Folgeuntersuchung im Jahr 2021 fand an einem 3 Tesla Hochfeld-System (Magnetom Prisma von Siemens Healthineers, Deutschland, Body Spule) statt. In allen Untersuchungen wurde kein Kontrastmittel verwendet.

Es liegen für die vorliegende Studie die Lendenwirbelsäule in einer Knochenrekonstruktion der Computertomografie sowie die T2-gewichtete Turbo-Spin-Echo Sequenz (TSE) im Sagittal- und Transversalschnitt mit einer Echozeit (TE) von 120 ms, einer Repetitionszeit (TR) von 3500 ms und einer Schichtdicke von 3 mm vor (Untersuchungssequenz 2015). Für das Jahr 2021 liegen die T2-gewichtete TSE-Sequenz mit einer TE von 114 ms, TR von 3030 ms und einer Schichtdicke von 2,5 mm im Sagittalschnitt sowie zusätzlich eine T2-gewichtete 3-dimensionale Sequenz (CISS; Con-

► **Tab. 1** Übersicht 5 Deutsche Schäferhunde, Zuchtlinie und die Nutzung.

► **Table 1** Overview 5 German Shepherd Dogs, breeding line and use.

Hund	Zuchtlinie	Nutzung
Hündin 1	Leistungslinie	Agility & Rally Obedience; mittleres-hohes Niveau
Hündin 2	Showlinie	Gebrauchshundesport/Obedience; Freizeitsport
Rüde 1	Leistungslinie	Internationaler Gebrauchshundesport; intensive Nutzung, hohes Niveau
Rüde 2	Showlinie	Bis 2019 internationaler Gebrauchshundesport hohes Niveau, seitdem Familienhund
Rüde 3	Leistungslinie	Internationaler Gebrauchshundesport; intensive Nutzung, hohes Niveau

structive interference in steady state, Gradienten-Echo Sequenz mit einer TE von 3,5 ms, TR von 7,7 ms sowie Isovoxeln mit einer Größe von 0,7 mm) vor.

Der Tierversuchsantrag ist 2015 von der Ethikkommission des Landes Hessen und Thüringen (Reg. Nr. 22-2684-04-02-075/14) sowie 2021 unter folgendem Aktenzeichen (V 54 - 19 c 20 15 h 02 GI 18/17 kTV 20/2020) genehmigt worden.

Zu der Studiengruppe zählen 5 unkastrierte Deutsche Schäferhunde (n=5), davon 2 weibliche (Hündin 1, Hündin 2) und 3 männliche (Rüde 1, Rüde 2, Rüde 3) Hunde. Alle Probanden werden in unterschiedlichem Maß sportlich geführt (► **Tab. 1**). Alle Hunde wurden im Alter von mind. 12 Monaten einer offiziellen Zuchtuntersuchung innerhalb des Deutschen Schäferhundvereins (SV) (Röntgen auf Ellbogengelenkdysplasie [ED] und Hüftgelenkdysplasie [HD] und 3 Hunde zusätzlich einer Auswertung des lumbosakralen Übergangs) unterzogen. Zu den eingeschlossenen Kriterien und Auffälligkeiten des lumbosakralen Übergangs zählen hierbei lumbosakrale Übergangswirbel (Typ 1 bis Typ 3), Osteochondrosedefekte oder eine deformierte Sakrumendplatte [1][10]. Alle untersuchten Hunde sind als ED frei beurteilt worden. Die HD-Ergebnisse liegen zwischen A und B und der lumbosakrale Übergang ist in den vorliegenden Gutachten als unauffällig beurteilt.

Der Body Condition Score liegt bei allen Hunden zwischen 3/9 und 5/9 mit einem Körpergewichtsmittelwert von 34,6 kg (min. 26,7 kg/max. 45,0 kg). Das Alter der Hunde beträgt 2015 für Hündin 1: 21 Monate, Hündin 2: 32 Monate, Rüde 1: 27 Monate, Rüde 2: 32 Monate und Rüde 3: 19 Monate. Im Jahr 2021 ist Hündin 1: 92 Monate, Hündin 2: 102 Monate, Rüde 1: 97 Monate, Rüde 2: 96 Monate und Rüde 3: 92 Monate alt.

Die Probanden werden einer allgemeinen klinischen, orthopädischen und neurologischen Untersuchung unterzogen und anschließend mittels Diazepam (0,5 mg/kg i.v.) und Propofol (2-4 mg/kg i.v.) narkotisiert. Nach Intubation wird die Narkose mit Isofluran (1,5-3 Vol%) und Sauerstoff aufrechterhalten.

Die Messungen der Facettengelenkwinkel, der Signalintensität und der Bandscheibenfläche für die Lokalisation von L5/6, L6/7 und



► **Abb. 2** Angulation aller 3 Ebenen zur Vorbereitung für die Facettengelenkmessung am Beispiel von L6/7 in der computertomografischen Untersuchung. Quelle: C. Paulus.

► **Fig. 2** Angulation of all 3 planes in preparation for facet joint measurement using L6/7 as an example in computed tomographic examination. Source: C. Paulus.

L7/S1 wird an einem Apple iMac (Retina 5K, 27 Zoll, 2019) mit Hilfe des frei verfügbaren und kostenlosen Programms „Horos“ (Horos Project) durchgeführt. Jede Messung wird 5-mal im Abstand von mindestens einer Woche wiederholt, um Messungenauigkeiten zu minimieren. Aus den 5 wiederholten Messungen wird anschließend der Mittelwert errechnet. Grundlage für die Messung der Facettengelenkwinkel ist die Methode von Benninger et al. [14], welche im Rahmen des freizugänglichen Auswertungsprogrammes „Horos“ modifiziert wurde. Hierfür wird die computertomografische Untersuchung von 2015 (Knochenfenster) und die magnetresonanztomografische Untersuchung von 2021 (CISS 3 D Sequenz) herangezogen.

Für die Messungen für die Lokalisationen L5/6, L6/7 und L7/S1 wird wie folgt verfahren (► **Abb. 2**):

1. Alle 3 Schnittebenen werden auf einem Bildschirm nebeneinander visualisiert.
2. Die transversale Ebene entsteht durch die mittige Angulation der Achse des Zwischenwirbelspalts im Sagittalschnitt.
3. Die sagittale Ebene wird anhand der dorsalen Ebene entlang der Lendenwirbelsäule ausgerichtet.
4. Die Höhe der dorsalen Ebene wird in der transversalen Ebene auf mittlerer Höhe des Facettengelenks festgelegt.

Daraufhin kann eine Hilfslinie in der dorsalen und transversalen Ebene gezogen werden, an welcher im Anschluss mit dem Tool „Angle“ der sich zwischen den Hilfslinien befindliche Facettengelenkwinkel bestimmen lässt. Zusätzlich wird für die Untersuchung der Facettengelenkmorphologie die Form jedes einzelnen Facettengelenks für die Lokalisationen L7/S1, L6/7 und L5/6 im Transversalschnitt in der computertomografischen Untersuchung aus dem Jahr 2015 beurteilt. Als Vorlage dient hierzu die Studie von Benninger et al. [14]. Hierbei können folgende Facettengelenkformen auftreten: gerade, gewinkelte, runde und bogenförmige. Diese Facettengelenkformen können symmetrisch oder asymmetrisch auftreten. Bei runden, gebogenen und bogenförmigen Fa-

cettengelenken wird der Winkel durch eine platzierte Linie zwischen dem proximolateralen und distomedialen Gelenkrändern näherungsweise bestimmt.

Die Messung der Signalintensität der Bandscheiben wird in Anlehnung an die Studie von Amort et al. [12] durchgeführt. Dafür wird die Signalintensität der gesamten Bandscheibe bei L5 bis S1 im Transversal- und Sagittalschnitt mittels „Closed Polygon-Tool“ umfahren und gemessen. Anschließend wird die Signalintensität „Mean“ (Helligkeit aller Pixel in dem markierten Bereich) und die maximale Fläche (in mm²) der Bandscheiben im Transversal- und Sagittalschnitt bestimmt. Da der Nucleus pulposus in den MRT-Bildern aus dem Jahr 2021 nicht abgrenzbar ist, wird auf eine vergleichende Auswertung der Nuclues pulposus-Signalintensitäten in beiden Jahren verzichtet. Des Weiteren erfolgt eine subjektive, visuelle Gradeinteilung der Bandscheibendegeneration nach der Methode von Seiler et al. [19] in der sagittalen Ebene, jeweils aus dem Jahr 2015 und 2021. Außerdem werden weitere Befunde wie ventrale und laterale Spondylosen, Bandscheibenprotrusionen, juxtaartikuläre Zysten und andere Pathologien erfasst.

Statistische Auswertung

Für die Analyse werden folgende Daten erhoben: Jahr (2015; 2021), Lokalisation (L5/6; L6/7; L7/S1), Schnittebene (dorsal, transversal, sagittal), Facettengelenkwinkel (°), Gradeinteilung nach Seiler (1; 2; 3; 4), Signalintensität (mean) sowie die maximale Bandscheibenfläche (mm²). Zusätzlich wird für die Facettengelenkuntersuchung die Seite (links; rechts) notiert. Im Anschluss werden aus dem rechten und linken Facettengelenkwinkel des jeweiligen Hundes ein Mittelwert gebildet sowie aus der Winkeldifferenz zwischen rechtem und linkem Facettengelenkwinkel des jeweiligen Hundes die Facettengelenkwinkeldifferenz bestimmt.

Für die statistischen Auswertungen wird zunächst für jedes Tier der Mittelwert aus den 5 Messwiederholungen pro Untersuchungs-jahr (2015; 2021) für die Parameter Facettengelenkwinkel (°), Sig-

► **Tab. 2** Übersicht der mittleren Signalintensität (mean) der Bandscheiben errechnet aus allen 5 Probanden im Jahr 2015 und 2021 im Transversal- und Sagittalschnitt.

► **Table 2** Overview of the mean signal intensity (mean) of the intervertebral discs calculated from all 5 subjects in 2015 and 2021 in the transversal and sagittal section.

	L7/S1 trans	L7/S1 sag	L6/7 trans	L6/7 sag	L5/6 trans	L5/6 sag
Signalintensität (mean)						
2015	227,6	90,9	289,5	147,3	344,6	156,7
Standardabweichung	104,6	45,8	83,4	45,1	147,8	44,9
2021	45,1	46,1	55,4	118,2	60,7	134,3
Standardabweichung	6,5	8,9	7,4	24,2	9,1	34,3
Signalreduktion						
	182,5	44,8	234,1	29,1	283,9	22,4
	80,18 %	49,28 %	80,86 %	19,75 %	82,38 %	14,29 %

nalintensität (mean) und maximale Bandscheibenfläche (mm²) gebildet. Diese Parameter werden getrennt nach Lokalisation (L5/6, L6/7, L7/S1) und Schnittebene (dorsal, transversal, sagittal) ausgewertet. Ergänzend dazu wird für die Facettengelenkwinkeluntersuchung die Seite (links, rechts) mit einbezogen. Mit Hilfe eines gepaarten t-Tests wird daraufhin überprüft, ob sich die Mittelwerte jeweils für die untersuchten Parameter zwischen den Jahren (2015; 2021) signifikant voneinander unterscheiden, also ob sich eine signifikante Änderung der Parameter mit der Zeit ergeben hat. Die Voraussetzung für den gepaarten t-Test, dass die Differenzen der Messwiederholung der beiden Jahre normalverteilt sind, wird mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests überprüft. Um den Zusammenhang zwischen der Gradeinteilung nach Seiler und den Facettengelenkmittelwerten und der Facettengelenkwinkeldifferenz der Tiere zu überprüfen, werden Spearman Korrelationen getrennt nach Jahren, Lokalisation, Seite und Schnittebene durchgeführt. Als Signifikanzgrenze wird für alle Auswertungen $p < 0.05$ gewählt.

Die Statistik wird mithilfe der statistischen Software SAS und in Kooperation mit der AG Biomathematik und Datenverarbeitung der Justus-Liebig Universität Gießen durchgeführt.

Ergebnisse

Deskriptive Ergebnisse

Signalintensität und Einteilung der Graduierung nach Seiler et al. [19]

Der Bandscheibendegenerationsgrad nimmt in der Einteilung von Seiler et al. [19] bei allen Studienprobanden von 2015 (Mittelwert: Grad 2,2) bis 2021 (Mittelwert: Grad 3,6) bei L7/S1 zu (► **Tab. 2**). Bei den Bandscheiben von L5/6 sowie L6/7 zeigt sich lediglich eine geringgradige Zunahme des Degenerationsgrades von 1,6 auf 2,0. Rüde 2 und Rüde 3 weisen bei L7/S1 bereits im Jahr 2015 einen Bandscheibendegenerationsgrad $\frac{3}{4}$ auf, Rüde 1 und Hündin 2 einen Bandscheibendegenerationsgrad $\frac{2}{4}$. Nur Hündin 1 zeigt 2015 einen Bandscheibendegenerationsgrad $\frac{1}{4}$ auf.

In der Messung der Signalintensität zeigt sich transversal bei 4 von 5 Hunden ein Abfall der gemessenen Signalintensität der Bandscheiben. Nur Rüde 2 zeigt zwischen 2015 und 2021 im Sa-

gittalschnitt einen Signalanstieg, an allen 3 analysierten Lokalisationen. Im Gegensatz dazu, ergibt das Graduierungsschema nach Seiler et al. [19] bei diesem Rücken lumbosakral eine Zunahme der Bandscheibendegeneration von Grad 3 auf Grad 4, an den Lokalisationen L6/7 und L5/6 blieb die Einteilung mit Grad 2 konstant.

In den transversalen Messungen von 2015 zeigt Hündin 1, im Vergleich zu den anderen Probanden, an allen 3 Lokalisationen eine höhere Signalintensität der Bandscheiben, wohingegen die Signalintensität der anderen auf einem ähnlichem und niedrigem Niveau liegt. Dieser deutliche Unterschied zwischen Hündin 1 und den anderen 4 Hunden ist 2021 nicht nachvollziehbar. Hier ergeben alle Messungen vergleichbare Werte (► **Abb. 3**).

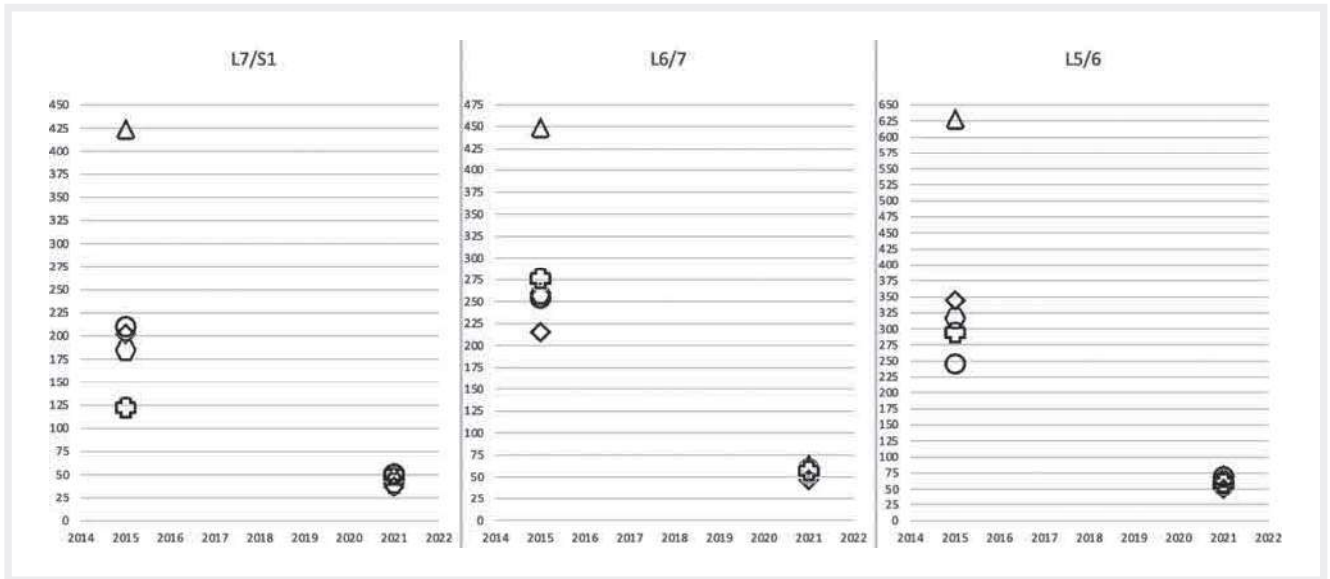
Diese Beobachtungen sind im Sagittalschnitt nicht nachvollziehbar.

Facettengelenke

In der Untersuchung der Facettengelenkmorphologie zeigen sich gerade, runde, bogenförmige, gewinkelte sowie asymmetrische Facettengelenke [8] sowie Kombinationen der beschriebenen Konformationen zwischen der linken und rechten Seite (► **Tab. 3**).

Lokalisation L7/S1

Bei L7/S1 lässt sich im Transversalschnitt 2015 und 2021 jeweils für die rechte und linke Seite die Tendenz nachvollziehen, dass ein größerer Facettengelenkwinkel mit einem niedrigeren Grad in der Seilergraduierung und einer höheren Signalintensität assoziiert ist. Bei 4 von 5 Hunden lässt sich dieser Effekt auch mit den Ergebnissen des errechneten Facettengelenkmittelwertes (Mittelwert errechnet aus dem rechten und linken Facettengelenkwinkel des jeweiligen Hundes) im Vergleich zur Signalintensität nachvollziehen. Kein Zusammenhang zeigt sich im Dorsalschnitt zwischen dem Facettengelenkwinkel und der Seilergraduierung sowie dem Facettengelenkmittelwert und der Signalintensität 2021. Die Facettengelenkwinkeldifferenz (errechnet aus der Differenz zwischen rechten und linken Facettengelenkwinkel des jeweiligen Hundes) zeigt im Transversalschnitt 2015 und 2021, dass eine geringe Winkeldifferenz mit einer niedrigen Seilergraduierung assoziiert ist. Andeutungsweise lässt sich dieser Effekt zusätzlich im Transversalschnitt



► **Abb. 3** Entwicklung der Mittelwerte der Bandscheibensignalintensität der 5 Probanden im Transversalschnitt für das Jahr 2015 und 2021 an den Lokalisationen L7/S1, L6/7 und L5/6-Dreieck: Hündin 1; Kreis: Hündin 2; Viereck: Rüde 1; Sechseck: Rüde 3; Kreuz: Rüde 2 Quelle: C. Paulus.

► **Fig. 3** Progression of the mean values of the disc signal intensity of the 5 subjects in transverse section for the year 2015 and 2021 at the locations L7/S1, L6/7 and L5/6-triangle: female 1; circle: female 2; quadrilateral: male 1; hexagon: male 3; cross: male 2 Source: C. Paulus.

► **Tab. 3** Übersicht der Facettengelenkmorphologie an der kaudalen Lendenwirbelsäule.

► **Table 3** Overview of facet joint morphology in the caudal lumbar spine.

Hund	L7/S1	L6/7	L5/6
Hündin 1	gerade	bogenförmig	gerade
	symmetrisch	geringgradig asymmetrisch	asymmetrisch
Hündin 2	konvex	rundlich	bogenförmig
	symmetrisch	symmetrisch	symmetrisch
Rüde 1	gerade	gewinkelt	gerade
	symmetrisch	symmetrisch	symmetrisch
Rüde 2	gerade	bogenförmig	gewinkelt
	symmetrisch	symmetrisch	asymmetrisch
Rüde 3	gerade	gerade	gerade
	symmetrisch	symmetrisch	symmetrisch

im Jahr 2015 zwischen einer kleinen Winkeldifferenz und der gemessenen Signalintensität nachvollziehen. Im Dorsalschnitt lässt sich für beide Jahre keine Korrelation zur Seilergraduierung oder zur gemessenen Signalintensität nachvollziehen.

Lokalisation L6/7

Auf Höhe der Lokalisation von L6/7 lässt sich aufgrund der einheitlichen Seilergraduierung 2/4 im Jahr 2021 kein Effekt des Facettengelenkwinkels auf die Bandscheibendegeneration nachweisen. Im Jahr 2015 hingegen scheint ein kleinerer Facettengelenkwinkel im

Dorsalschnitt mit einer niedrigeren Seilergraduierung assoziiert zu sein. Die Differenz der Facettengelenkwinkel von rechts und links zeigt keinen Einfluss auf die Seilergraduierung. Bei Betrachtung der gemessenen Signalintensitäten bei L6/7 zeigt sich in der Folgeuntersuchung, dass ein größerer Facettengelenkwinkel (rechte und linke Seite) im Dorsalschnitt sowie ein großer Mittelwert mit einer höheren Signalintensität einhergeht. Im Transversalschnitt ist dies für beide untersuchten Jahre bei 4 von 5 Hunden nachvollziehbar. Für das Jahr 2015 ist diesbezüglich kein Zusammenhang nachvollziehbar, ebenso wie für die Differenz der Facettengelenkwinkel 2015 und 2021.

Lokalisation L5/6

Bei L5/6 lässt sich im Dorsalschnitt kein Zusammenhang zwischen dem Facettengelenkwinkel und der Seilergraduierung nachvollziehen. Im Gegensatz dazu gehen im Jahr 2015 im Transversalschnitt die kleineren Facettengelenkwinkel (rechts und links), der Mittelwert und die Facettengelenkwinkeldifferenz mit einer höheren Seilergraduierung einher. Für das Jahr 2021 ergibt sich in diesem Vergleich kein Zusammenhang. Bei der Korrelation zwischen Facettengelenkwinkeln und Signalintensität stellen sich die Ergebnisse heterogener dar. Hier zeigt sich 2015 im Dorsalschnitt beidseits sowie für den errechneten Facettengelenkmittelwert ein Zusammenhang zwischen einem weiten Winkel und einer niedrigen Signalintensität, wohingegen für das Jahr 2021 eine weitere Facettengelenkwinkel mit einer hohen Signalintensität korreliert zu sein scheint. Dieser Zusammenhang ist im Transversalschnitt nicht nachvollziehbar. Die Facettengelenkwinkeldifferenz und der Signalintensität zeigen für beide Jahre keine Korrelation. Der Facettengelenkwinkel nimmt innerhalb eines Untersuchungszeitpunktes in transversaler Ebene von kaudal nach kranial (von S1 nach L5) ab, wohingegen er in der dorsalen Ebene kontinuierlich zunimmt (► **Tab. 4**).

► **Tab. 4** Übersicht der Facettengelenkwinkelmittelwerte aller 5 Probanden von L5 bis S1 im Seitenvergleich und diese vergleichend zu den Jahren 2015 und 2021 in Grad°.

► **Table 4** Overview of facet joint angle mean values of all 5 subjects from L5 to S1 in side-by-side comparison and these comparing to 2015 and 2021 in degree°.

Facettengelenkwinkel	L7/S1 links	L7/S1 rechts	L6/7 links	L6/L7 rechts	L5/6 links	L5/6 rechts
2015						
transversal	41,92	42,79	17,27	15,31	13,34	12,36
Standardabweichung	3,78	3,11	2,11	2,33	2,82	3,30
2021						
transversal	42,66	42,52	18,01	16,13	13,95	13,10
Standardabweichung	4,79	3,90	2,75	2,47	3,18	2,62
2015						
dorsal	7,50	7,56	10,22	9,16	11,28	10,41
Standardabweichung	3,20	2,87	2,97	2,61	4,12	1,98
2021						
dorsal	9,35	9,16	11,23	10,57	13,45	13,40
Standardabweichung	3,75	3,67	2,64	2,96	4,99	3,64
Erweiterung Winkel zwischen 2015 und 2021	L7/S1 links	L7/S1 rechts	L6/7 links	L6/L7 rechts	L5/6 links	L5/6 rechts
transversal	0,74	-0,27	0,74	1,00	0,61	0,74
dorsal	1,85	1,60	1,01	1,41	2,17	2,99

Bei den Facettengelenken von L5 bis S1 eine Erweiterung des Facettengelenkwinkels im Verlauf von 2015 bis 2021 zu verzeichnen, mit Ausnahme von L7/S1 auf der rechten Seite. Die Erweiterung des Facettengelenkwinkels beträgt insgesamt in der transversalen Ebene im Mittel $0,54^\circ$ sowie in der dorsalen Ebene $1,8^\circ$ über den Zeitraum von 6 Jahren. Dies bedeutet im Transversalschnitt in etwa eine Winkelzunahme von $0,09^\circ$ sowie $0,30^\circ$ im Dorsalschnitt pro Lebensjahr. Zudem zeigt sich im Transversalschnitt ein großer Winkelunterschied von $26,06^\circ$ zwischen den Facettengelenkwinkeln von L7/S1 und L6/7 (► **Tab. 4**).

Des Weiteren deutet die Analyse der degenerativen Veränderungen bei dem Deutschen Schäferhund mit den kleinsten Facettengelenkwinkeln (Hündin 2) im Vergleich zu dem Hund mit den weitesten Winkeln (Rüde 2, 2015, L7/S1 & L6/7) nicht auf eine frühere bzw. vermehrte Degeneration der Bandscheiben hin. Beide weisen eine vergleichbare Signalintensität und ähnliche Seilergraduierung auf.

Bandscheibenfläche

Bei der Untersuchung der maximalen Bandscheibenfläche nimmt die gemessene Fläche im Sagittalschnitt von L7/S1 nach kranial bis L5 ab und dies zu beiden Untersuchungszeitpunkten (► **Tab. 5**). Die größte Differenz der maximalen Bandscheibenfläche zwischen den beiden Untersuchungszeitpunkten zeigt sich lumbosakral. Dies ist in beiden Schnittebenen reproduzierbar.

Signifikante Ergebnisse

In der statistischen Untersuchung zeigen alle erhobenen Daten eine annähernde Normalverteilung. Bei der Untersuchung der Signalintensität zeigt sich bei den 3 analysierten Lokalisationen in der

transversalen sowie in der sagittalen Messebene eine Signalreduktion der Bandscheiben im Verlauf von 2015 bis 2021 von bis zu 82% (► **Tab. 2**). Hierbei handelt es sich um signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) bei den Werten von L7/S1 trans ($p = 0,02$), L6/7 trans ($p = 0,003$) und L5/6 trans ($p = 0,01$).

Ein statistisch signifikanter Unterschied der Erweiterung der Facettengelenkwinkel zwischen dem Jahr 2015 und 2021 lässt sich bei L7/S1 dorsal links ($p = 0,01$), L7/S1 dorsal rechts ($p = 0,04$), L6/7 dorsal rechts ($p = 0,03$) und L5/6 dorsal rechts ($p = 0,03$) nachweisen. Die statistische Analyse ergibt keine signifikanten Ergebnisse für den Facettengelenkwinkel (rechts und links), den errechneten Mittelwert der Facettengelenke sowie für die Differenz zwischen den Facettengelenken rechts und links an jeder Lokalisation in Korrelation zum Seiler Grad sowie zur Signalintensität, mit Ausnahme für die Facettengelenkwinkel im Dorsalschnitt bei L5/6 im Jahr 2015 ($p = 0,03$). Die Ergebnisse bei L5/6 in der Transversalebene zwischen den Mittelwerten der Facettengelenkwinkel und dem Seiler Grad sind in der Spearman Analyse mit einem p-Wert von 0,057 beinahe signifikant. Für das Jahr 2021 ergibt sich in diesem Vergleich kein Zusammenhang. Bei der Korrelation zwischen Facettengelenkwinkeln und Signalintensität stellen sich die Ergebnisse heterogener dar. Hier zeigt sich im Dorsalschnitt, nicht aber im Transversalschnitt, für das rechte und linke Facettengelenk im Jahr 2015 sowie für den Facettengelenkmittelwert ein signifikanter Zusammenhang ($p = 0,03$) zwischen einem weiten Winkel und einer niedrigen Signalintensität, wohingegen für das Jahr 2021 ein weiter Facettengelenkwinkel mit einer hohen Signalintensität zu korrelieren scheint. Der Wert für 2021 ist jeweils nicht signifikant ($p = 0,1$). Für den Vergleich der Facettengelenkdifferenz und der

► **Tab. 5** Veränderungen der Bandscheibenflächenmittelwerte aller 5 Probanden zwischen den Jahren 2015 und 2021.

► **Table 5** Changes in mean values of the disc surface from all 5 subjects between the years 2015 and 2021.

Maximale Bandscheibenfläche in mm ²	L7/S1 trans	L7/S1 sag	L6/7 trans	L6/7 sag	L5/6 trans	L5/6 sag
2015	461,06	96,81	445,72	70,31	453,73	62,58
Standardabweichung	85,34	26,98	83,25	23,25	94,76	22,61
2021	539,96	144,4	417,35	75,93	445,46	73,53
Standardabweichung	108,16	24,74	86,54	21,47	116,1	27,98
Flächendifferenz in mm²	78,9	47,59	-28,37	5,62	-8,27	10,95

Signalintensität zeigt sich kein Zusammenhang. Die Streuung der Facettengelenkwinkel stellt sich bei L6/7 und L5/6 für beide untersuchten Jahre in der Transversalebene kleiner dar, verglichen mit der dorsalen Schnittebene. Diese Ergebnisse sind signifikant bei L6/7 für das Jahr 2015 bei 3 Hunden, für das Jahr 2021 bei einem Hund und bei L5/6 im Jahr 2015 bei 4 von 5 Hunden sowie 2021 bei 3 Hunden. Bei L7/S1 sind die Ergebnisse für 2015 und 2021 heterogen und nicht signifikant.

Bei der statistischen Untersuchung der Bandscheibenfläche lässt sich, je nach Lokalisation, eine Bandscheibenvergrößerung oder eine Bandscheibenverkleinerung erkennen. Die Ergebnisse sind signifikant ($p < 0,05$) für die Lokalisationen L7/S1 sagittal ($p = 0,01$),

L6/7 transversal ($p = 0,04$) sowie bei L5/6 sagittal ($p = 0,02$). Für die anderen Lokalisationen sind die Ergebnisse nicht signifikant ($p > 0,05$) (► **Tab. 5**).

Weiterführende Beschreibung

Keine Studienteilnehmer zeigen an den Wirbelkörpern von L5 bis S1 eine nachvollziehbare Pathologie der kaudalen Lendenwirbelsäule und des lumbosakralen Übergangs. Vier von 5 Deutschen Schäferhunden (mit Ausnahme von Rüde 1) weisen 2021 eine gering- bis mittelgradige Bandscheibenprotrusion bei L7/S1 mit Kontakt zu den Cauda equina-Fasern auf. Zwei dieser 4 Hunde (Hündin 2; Rüde 2) weisen aufgrund der Bandscheibenprotrusion eine geringgradige

Kompression der Cauda equina-Fasern auf. Bei Rüde 3 kommt es zu einer dezenten Foraminalstenose beidseits. Nebenbefundlich weisen alle 5 Deutschen Schäferhunde in der Untersuchung 2021 juxtaartikuläre Zysten auf, allerdings ohne eine nachvollziehbare Kompression des Rückenmarks oder des Spinalnervs.

Diskussion

Die Magnetresonanztomographie ist ein sensitives Verfahren, um Bandscheibendegenerationen zu detektieren [19]. Eine semiquantitative, ROI-gestützte Bestimmung der Signalintensität der Bandscheiben in der MRT bietet im Vergleich zu einer subjektiven und untersucherabhängigen Auswertung Vorteile einer hohen Reproduzierbarkeit [22].

In der vorliegenden Studie lässt sich eine signifikante Reduktion der gemessenen Signalintensität der Bandscheiben der kaudalen Lendenwirbelsäule zwischen 82% und 80% im Transversalschnitt (► **Tab. 2**) sowie eine Zunahme des Degenerationsgrades in der Einteilung nach Seiler et al. [8] im Verlauf von 2015 bis 2021 nachvollziehen. Dies unterstreicht die Möglichkeit die subjektive Methode der Bandscheibendegenerations-Graduierung nach Seiler et al. [19], durch eine ROI-gestützte digitale Signalintensitätsbestimmungsmethode zu untermauern. Die Ergebnisse decken sich mit der Studie von Amort et al. [12]. Die Korrelation der gemessenen Signalintensität und der Seiler Graduierung könnten, bei ausreichend vielen Probanden, zukünftig bei der Entwicklung von Signalintensitätstabellen genutzt werden, in welchen ein gemessener Signalintensitätswert einem dezidierten Seiler Grad zuzuordnen ist. Dies könnte bei der Evaluation der Bandscheibendegeneration z. B. bei unerfahrenen Untersuchern behilflich sein sowie zu einem objektivierten Vergleich zwischen verschiedenen Studien zur Bandscheibendegeneration führen.

Die signifikanten Signalintensitätsmesswerte im Transversalschnitt und nicht signifikanten Werte in der sagittalen Ebene lassen vermuten, dass die Messergebnisse im Transversalschnitt konsistenter sind. Ursächlich für die nicht signifikanten Ergebnisse im Sagittalschnitt können beispielsweise parasagittale Bandscheibenprotrusionen oder unscharf abgrenzbare ventrale Spondylosen sein, welche fälschlicherweise in das gemessene Bandscheibensignal aufgenommen werden. Der Grund des gemessenen Signalanstiegs bei Rüde 2 im Sagittalschnitt von 2015 bis 2021 kann nicht abschließend geklärt werden, da sich erwartungsgemäß im Transversalschnitt eine Signalreduktion nachvollziehen ließ. Ätiologisch für diese paradoxen Ergebnisse müssen Schichtdickenartefakte, Schichtdickenvarianz [25], eine Varianz im Hydrationsstatus [26] der Bandscheibe oder Messungenauigkeiten diskutiert werden.

In der multifaktoriellen Genese der in der Literatur beschriebenen frühzeitigen Bandscheibendegeneration der kaudalen Lendenwirbelsäule [2][13][15][16][27] spielen die Facettengelenke eine bedeutende Rolle [13][16], da diese entlang der Wirbelsäule die auftretenden Kompressionsbewegungen kompensieren [17]. Allerdings ist anzunehmen, dass durch die ineffektive Facettengelenkmorphologie [16] die auftretenden Kompressionskräfte beim Deutschen Schäferhund nur eingeschränkt reduziert werden können und dadurch die Bandscheibe einer erhöhten Belastung ausgesetzt ist [13]. Über die Auswirkung des Facettengelenkwinkels auf

die Bandscheibendegeneration existieren unterschiedliche Auffassungen. Während Seiler et al. [19] einen Zusammenhang zwischen einem großen Facettengelenkwinkel, einer großen Winkeldifferenz und einer frühen Bandscheibendegeneration vermutete [12], beschreiben Rossi et al. [28], dass ein kleiner Facettengelenkwinkel mit einem höheren Degenerationsgrad der zugehörigen Bandscheibe assoziiert ist. In der hier vorliegenden Studie zeigt die Analyse der degenerativen Veränderungen bei dem Deutschen Schäferhund mit den kleinsten Facettengelenkwinkeln (Hündin 2) im Vergleich zu dem Hund mit den weitesten Winkeln (Rüde 1 im Jahr 2015 bei L7/S1-L6/7), entgegen der Aussage von Rossi et al. [28], keine frühere bzw. vermehrte Degeneration der Bandscheiben. Ein äußerst kleiner oder großer Facettengelenkwinkel scheint, anhand der vorliegenden Studie, keine Ursache für eine frühzeitige Bandscheibendegeneration darzustellen.

Wie von Benninger et al. [14] beschrieben, weisen die Facettengelenke eine morphologische Varianz auf und treten symmetrisch, asymmetrisch, gerade, rund, gewinkelt und bogenförmig auf. Des Weiteren beschreiben Benninger et al. [14], dass asymmetrische Facettengelenke beim Deutschen Schäferhund häufiger als bei anderen Hunderassen auftreten. Bei den hier untersuchten Facettengelenken sind insgesamt 3 Gelenke asymmetrisch. Zwei der 3 asymmetrischen Facettengelenke finden sich bei Hündin 1. Diese weist im Jahr 2015 die höchste Bandscheibensignalintensität sowie einen Seiler Grad 1 auf. Aufgrund dessen lässt sich anhand der hier erhobenen Daten keine frühzeitige Bandscheibendegeneration mit einem asymmetrischen Facettengelenk assoziieren. Die Varianz der Facettengelenkmorphologie könnte unter anderem die Ursache für die gemessene Reduzierung des Facettengelenkwinkel bei der Messung von L7/S1 transversal auf der rechten Seite sein und es sich damit um ein nicht glaubwürdiges Ergebnis handeln.

Die in der transversalen Ebene gemessenen Facettengelenkwinkel, beginnend von L7/S1 bis nach kranial auf Höhe von L5/6 ziehend, nehmen von Segment zu Segment ab. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien [8][14], ebenso wie der kontinuierlich zunehmende Facettengelenkwinkel in der dorsalen Ebene. Gleichmaßen wie bei Benninger et al. [14], lässt sich eine Erweiterung der Facettengelenkwinkel zwischen L5 und S1 mit Ausnahme von L7/S1 im Transversalschnitt nachweisen. Allerdings zeigt sich in der hier vorliegenden in vivo-Studie im Vergleich zu der Kadaverstudie von Benninger et al. [14] eine geringere Winkelvergrößerung der Facettengelenke pro Lebensjahr. Die Werte betragen im Mittel 0,09° pro Lebensjahr (trans) sowie 0,30° pro Lebensjahr (dors), wohingegen die Ergebnisse der Kadaverstudie eine Winkelvergrößerung im Transversalschnitt von 0,42° pro Lebensjahr und im Dorsalschnitt von 0,44° aufweisen. Zu Bedenken ist hier, dass es sich bei Benninger et al. [14] um einen inter-Subjekt Vergleich handelt und nicht um eine intra-Subjekt Studie. Des Weiteren sind in der Studie von Benninger et al. [14] sowohl Deutsche Schäferhunde als auch Hunde anderer Rassen mit einbezogen worden. Abschließend lässt sich festhalten, dass die progressive Facettengelenkerweiterung bei den hier untersuchten gesunden Deutschen Schäferhunden pro Lebensjahr geringer ausfällt als die in der Literatur postulierten Werte. Allerdings zeigt die kontinuierliche Erweiterung der Facettengelenkwinkel, dass an der lumbalen Wirbelsäule auch in gesunden Deutschen Schäferhunden fortwährend Umbauprozesse stattfinden. Ob diesbezüglich ein Unterschied zu

Deutschen Schäferhunden mit klinischen Symptomen einer degenerativen lumbosakralen Stenose besteht, muss zukünftig in nachfolgenden Studien genauer untersucht werden.

Wie in der Studie von Seiler et al. [8] zeigen sich auch in der hier vorgestellten Studie vergleichbare Ergebnisse bezüglich eines großen Winkelunterschiedes zwischen L7/S1 und L6/7 im Transversalschnitt im Mittel von 26,06°. Einen begünstigenden Zusammenhang zwischen ausgeprägter Winkeldifferenz benachbarter Facettengelenke und einer früher einsetzenden Bandscheibendegeneration erscheint damit wahrscheinlich [29] und wird mit den Ergebnissen dieser Studie gestützt.

Bezüglich der Bandscheibengröße ist eine Vergrößerung der maximalen Bandscheibenfläche erwartet worden z. B. aufgrund von Bandscheibenprotrusion über die vorherigen Bandscheibengrenzen hinaus [12]. Dies konnte, anders als erwartet, nicht an allen Lokalisationen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Bandscheibenfläche im Sagittal- und Transversalschnitt sprechen am wahrscheinlichsten für eine multifaktorielle Ätiologie. Auf diese Weise können sagittale als auch parasagittale Protrusionen zu einer Flächenvergrößerung führen. Des Weiteren resultieren am Untersuchungstag durchgeführte Belastungen z. B. durch Springen oder Toben aufgrund eines veränderten Wassergehaltes zu einer Verkleinerung der Bandscheibe [30]. Ebenfalls können Messungenauigkeiten einen großen Einfluss auf die Ergebnisse bei lediglich 5 Probanden haben.

Insgesamt ist die in dieser Studie verwendete Kohorte von 5 klinisch gesunden, Deutschen Schäferhunden sehr klein, um weitreichende, statistisch belastbare Ergebnisse zu erzielen. Zudem handelt es sich bei der untersuchten Gruppe um Hunde, welche überdurchschnittlich gearbeitet wurden. Somit kann es sich bei den oben beschriebenen Ergebnissen gegebenenfalls um ein gruppenindividuelles Ergebnis handeln. Zudem existieren 3 Schwierigkeiten bei der Durchführung der Messung der Facettengelenkwinkel. Erstens die jeweils exakt gleichen Angulation aller Scans in den 3 Rekonstruktionsebenen [8]. Dies ist bei einigen anatomischen Normvarianten nur annähernd durchführbar. Als Beispiel ist hier Rüste 2 anzuführen, da die Facettengelenke bei L5/6 und L6/7 nicht mittig über dem Zwischenwirbelspalt angelegt sind. Zweitens ist die Messung der Facettengelenkwinkel, welche morphologisch rund, oval oder bogenförmig, sind herausfordernd. Drittens führen kleinste Abweichungen zu deutlichen Wertänderungen der gemessenen Winkel.

Des Weiteren wurden viele verschiedene Ursachen für die frühzeitige lumbale Bandscheibendegeneration des Deutschen Schäferhundes in der Literatur beschrieben [2][13][15][16][27] und jede einzelne Ursache scheint einen gewissen Einfluss darauf auszuüben. Das von Worth et al. [15] beschriebene kleine Volumen der Neuroforamina lumbosakral bei Deutschen Schäferhunden mit einer degenerativen lumbosakralen Stenose wurde in dieser Studie nicht untersucht, da keiner der 5 Hunde klinische Anzeichen einer degenerativen lumbosakralen Stenose aufwies. Deshalb ist es sinnvoll, zukünftig Vergleichsstudien mit einer größeren Hundezahl, andere Rassen ähnlicher Statur sowie mit Hunden, welche Symptome einer degenerativen lumbosakralen Stenose aufweisen, durchzuführen.

FAZIT FÜR DIE PRAXIS

Bei dem Deutschen Schäferhund besteht eine Prädisposition für eine degenerative lumbosakrale Stenose [1][31][32] mit einer früher einsetzenden Bandscheibendegeneration am lumbosakralen Übergang im Vergleich zu anderen Rassen [8] [12]. Die Ursachen für eine Bandscheibenerkrankung sind multifaktoriell und reichen von einem signifikant unterschiedlichen Bewegungsmuster der Lendenwirbelsäule des Deutschen Schäferhundes [18] bis hin zu einer ineffektiven Facettengelenksgeometrie [16]. Möglicherweise führt die Facettengelenksmorphologie des Deutschen Schäferhundes zu einer eingeschränkten Kompensation der Kompressionskräfte [17] und resultiert einerseits in einer erhöhten Belastung der Bandscheiben [13] sowie in fortwährenden Umbauprozessen der lumbalen Wirbelsäule und einer damit einhergehenden messbaren kontinuierlichen Erweiterung der Facettengelenkwinkel [14].

Eine MRT-Untersuchung der Bandscheiben im Junghundealter hat bei unseren Probanden keinen Vorteil geboten, da sich bei den 5 untersuchten Deutschen Schäferhunden im Laufe der Zeit eine ausgeprägte lumbale Bandscheibendegeneration entwickelt hat und der initiale Bandscheibendegenerationsgrad keinen prognostischen Mehrwert aufwies. Eine Untersuchung kann bei unklaren Röntgenbefunden oder klinischen Symptomen als Ergänzung dienen. Ob sich andere Parameter für ein frühes Screening eignen, muss in weiteren Studien eruiert werden.

Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt neben meinen Co-Autoren meiner Betreuerin Frau Dr. Kerstin von Pückler sowie dem Bender Institute of Neuroimaging der JLU Gießen. Hier möchte ich mich vor allem bei Dr. Bertram Walter sowie Dr. Carlo Blecker bedanken.

Des Weiteren möchte an dieser Stelle ebenfalls Frau Ella Wenz und Frau Eva Billau danken, die mich tatkräftig unterstützt haben.

Ethische Stellungnahme

Die Studie wurde in strikter Übereinstimmung mit den Empfehlungen der Richtlinien für die Haltung und Verwendung von Versuchstieren des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Das Protokoll wurde von dem Regierungspräsidium Hessen und Thüringen unter folgenden Aktenzeichen (2015: Reg. Nr. 22-2684-04-02-075/14) sowie (2021: V 54 – 19 c 20 15 h 02 GI 18/17 kTV 20/2020) genehmigt.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte bestehen.

Literatur

- [1] Jaggy A, Lang J, Schawalder P. Cauda equina-Syndrom beim Hund. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1987; 129 (4): 171–192
- [2] Adams MA, Roughley PJ. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it? *Spine (Phila Pa 1976)* 2006; 31 (18): 2151–2161. doi:10.1097/01.brs.0000231761.73859.2c
- [3] Risio L de, Thomas WB, Sharp NJ. Degenerative Lumbosacral Stenosis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 2000; 30 (1): 111–132. doi:10.1016/S0195-5616(00)50005-9
- [4] Ghosh P, Taylor TK, Braund KG. The variation of the glycosaminoglycans of the canine intervertebral disc with ageing. I. Chondrodystrophoid breed. *Gerontology* 1977; 23 (2): 87–98. doi:10.1159/000212177
- [5] Brisson BA. Intervertebral disc disease in dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2010; 40 (5): 829–858. doi:10.1016/j.cvs.2010.06.001
- [6] Watt PR. Degenerative lumbosacral stenosis in 18 dogs. *J Small Animal Practice* 1991; 32 (3): 125–134. doi:10.1111/j.1748-5827.1991.tb00527.x
- [7] Mayhew PD, Kapatkin AS, Wortman JA, et al. Association of cauda equina compression on magnetic resonance images and clinical signs in dogs with degenerative lumbosacral stenosis. *J Am Anim Hosp Assoc* 2002; 38 (6): 555–562. doi:10.5326/0380555
- [8] Seiler GS, Häni H, Busato AR, et al. Facet joint geometry and intervertebral disk degeneration in the L5-S1 region of the vertebral column in German Shepherd dogs. *Am J Vet Res* 2002; 63 (1): 86–90. doi:10.2460/ajvr.2002.63.86
- [9] Steffen F, Berger M, Morgan JP. Asymmetrical, transitional, lumbosacral vertebral segments in six dogs: a characteristic spinal syndrome. *J Am Anim Hosp Assoc* 2004; 40 (4): 338–344. doi:10.5326/0400338
- [10] Flückiger MA, Damur-Djuric N, Hässig M, et al. A lumbosacral transitional vertebra in the dog predisposes to cauda equina syndrome. *Vet Radiol Ultrasound* 2006; 47 (1): 39–44. doi:10.1111/j.1740-8261.2005.00103.x
- [11] Julier-Franz C. Der lumbosakrale Übergangswirbel beim Deutschen Schäferhund. Formen, Häufigkeit und Genetik [Inaugural-Dissertation]. Justus-Liebig Universität, Klinik für Kleintiere- Chirurgie; 2006
- [12] Amort KH, Ondreka N, Rudolf H, et al. MR-imaging of lumbosacral intervertebral disc degeneration in clinically sound German shepherd dogs compared to other breeds. *Vet Radiol Ultrasound* 2012; 53 (3): 289–295. doi:10.1111/j.1740-8261.2011.01903.x
- [13] Schaub KI, Kelleners N, Schmidt MJ, et al. Three-Dimensional Kinematics of the Pelvis and Caudal Lumbar Spine in German Shepherd Dogs. *Front Vet Sci* 2021; 8: 709966. doi:10.3389/fvets.2021.709966
- [14] Benninger MI, Seiler GS, Robinson LE, et al. Effects of anatomic conformation on three-dimensional motion of the caudal lumbar and lumbosacral portions of the vertebral column of dogs. *Am J Vet Res* 2006; 67 (1): 43–50. doi:10.2460/ajvr.67.1.43
- [15] Worth AJ, Hartman A, Bridges JP, et al. Computed tomographic evaluation of dynamic alteration of the canine lumbosacral intervertebral neurovascular foramina. *Vet Surg* 2017; 46 (2): 255–264. doi:10.1111/vsu.12599
- [16] Breit S, Künzel W. On biomechanical properties of the sacroiliac joint in purebred dogs. *Annals of Anatomy – Anatomischer Anzeiger* 2001; 183 (2): 145–150. doi:10.1016/S0940-9602(01)80036-4
- [17] Cyron BM, Hutton WC, Stott JR. Spondylolysis: the shearing stiffness of the lumbar intervertebral joint. *Acta Orthop Belg* 1979; 45 (4): 459–469
- [18] Benninger MI, Seiler GS, Le Robinson, et al. Three-dimensional motion pattern of the caudal lumbar and lumbosacral portions of the vertebral column of dogs. *Am J Vet Res* 2004; 65 (5). doi:10.2460/ajvr.2004.65.544
- [19] Seiler G, Häni H, Scheidegger J, et al. Staging of lumbar intervertebral disc degeneration in nonchondrodystrophic dogs using low-field magnetic resonance imaging. *Vet Radiol Ultrasound* 2003; 44 (2): 179–184. doi:10.1111/j.1740-8261.2003.tb01268.x
- [20] Adams MA, Dolan P, Hutton WC. The stages of disc degeneration as revealed by discograms. *J Bone Joint Surg Br* 1986; 68 (1): 36–41. doi:10.1302/0301-620X.68B1.3941139
- [21] Marinelli NL, Haughton VM, Muñoz A, et al. T2 relaxation times of intervertebral disc tissue correlated with water content and proteoglycan content. *Spine (Phila Pa 1976)* 2009; 34 (5). doi:10.1097/BRS.0b013e318195dd44
- [22] Videman T, Nummi P, Battié MC, et al. Digital assessment of MRI for lumbar disc desiccation. A comparison of digital versus subjective assessments and digital intensity profiles versus discogram and macroanatomic findings. *Spine (Phila Pa 1976)* 1994; 19 (2): 192–198. doi:10.1097/00007632-199401001-00014
- [23] Pfirrmann CW, Metzendorf A, Zanetti M, et al. Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)* 2001; 26 (17): 1873–1878. doi:10.1097/00007632-200109010-00011
- [24] Schmidt M, Kramer M, Dennis R, Hrsg. MRT-Atlas ZNS-Befunde bei Hund und Katze. Stuttgart: Enke; 2015
- [25] Bushberg JT, Seibert JA, Leidholdt EM, et al. The Essential Physics of Medical Imaging. *Med. Phys.* 2003; 30 (7): 1936. doi:10.1118/1.1585033
- [26] Costi JJ, Hearn TC, Fazzalari NL. The effect of hydration on the stiffness of intervertebral discs in an ovine model. *Clinical Biomechanics* 2002; 17 (6): 446–455. doi:10.1016/S0268-0033(02)00035-9
- [27] Danielsson F, Sjöström L. Surgical treatment of degenerative lumbosacral stenosis in dogs. *Vet Surg* 1999; 28 (2): 91–98. doi:10.1053/jvet.1999.0091
- [28] Rossi F, Seiler G, Busato A, et al. Magnetic resonance imaging of articular process joint geometry and intervertebral disk degeneration in the caudal lumbar spine (L5-S1) of dogs with clinical signs of cauda equina compression. *Vet Radiol Ultrasound* 2004; 45 (5): 381–387. doi:10.1111/j.1740-8261.2004.04083.x
- [29] Gysling Ch. Der Alterungsprozess der Zwischenwirbelscheiben beim Deutschen Schäferhund [Inaugural-Dissertation]. Zürich: Universität Zürich; 1984
- [30] Kourtis D, Magnusson ML, Smith F, et al. Spine height and disc height changes as the effect of hyperextension using stadiometry and MRI. *Iowa Orthop J* 2004; 24: 65–71
- [31] Denny HR, GIBBS C, HOLT PE. The diagnosis and treatment of cauda equina lesions in the dog. *J Small Animal Practice* 1982; 23 (8): 425–443. doi:10.1111/j.1748-5827.1982.tb03772.x
- [32] Oliver JE, Selcer RR, Simpson S. Cauda equina compression from lumbosacral malarticulation and malformation in the dog. *J Am Vet Med Assoc* 1978; 173 (2): 207–214

Clinical, radiographic, and magnetic resonance imaging findings of gastrocnemius musculo-tendinopathy in various dog breeds

Susanne M. Kaiser¹; Oliver Harms^{2,3}; Martin Konar⁴; Anne Staudacher¹; Anna Langer³; Cetina Thiel¹; Martin Kramer¹; Sebastian Schaub¹; Kerstin H. von Pückler¹

¹Department of Veterinary Clinical Science, Small Animal Clinic, Justus Liebig University, Giessen, Germany; ²Small Animal Clinic, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, Germany; ³Tierklinik Lüneburg, Lüneburg, Germany; ⁴MR Support Service, Massa, Italy

Keywords

Gastrocnemius muscle, radiography, dog, musculotendinopathy, magnetic resonance imaging

Summary

Objectives: To describe clinical, radiographic, and magnetic resonance imaging (MRI) findings in 16 dogs diagnosed with gastrocnemius musculotendinopathy.

Methods: Retrospective evaluation of medical records, radiographs, and MRI results, as well as follow-up completed by telephone questionnaire.

Results: Most dogs had chronic hindlimb lameness with no history of trauma or athletic activities. Clinical examination revealed signs of pain on palpation without stifle joint instability. Seven dogs had radiographic signs of osteophyte formation on the lateral fabella. Magnetic resonance imaging revealed T2 hyperintensity and uptake of contrast

agent in the region of the origin of the gastrocnemius muscle. Changes were found in the lateral and medial heads of the gastrocnemius. Conservative treatment resulted in return to full function in 11 dogs. Two dogs showed partial restoration of normal function, one dog showed no improvement. Two dogs were lost to follow-up.

Clinical significance: Gastrocnemius musculotendinopathy is a potential cause of chronic hindlimb lameness in medium to large breed dogs. A history of athletic activity must not necessarily be present. Magnetic resonance imaging shows signal changes and uptake of contrast agent in the region of the origin of the gastrocnemius muscle. A combination of T1 pre- and post-contrast administration and T2 weighted sequences completed by a fat-suppressed sequence in the sagittal plane are well-suited for diagnosis. Conservative treatment generally results in return to normal function.

apy of choice, and prognosis is good to excellent (1, 2).

The gastrocnemius muscle consists of lateral and medial heads, which arise from the lateral and medial supracondylar tuberosity of the femur, respectively. Both heads contain a fabella. The muscle bellies fuse distally and the gastrocnemius tendon inserts on the calcaneal tuber. The gastrocnemius muscle extends the tarsus and flexes the stifle joint (3). Repeated myotendinous strain during exercise is reported to cause microtrauma to the origin of the gastrocnemius muscle in that the tendon fibres become overstretched, and some of them tear (4).

Radiographically, visible signs of osteophyte formation on the lateral fabella and mineralizations at the origin of the gastrocnemius muscle can be detected. Magnetic resonance imaging (MRI) shows oedematous changes and uptake of contrast material in the region of the origin of the gastrocnemius muscle (1, 2).

This retrospective study describes clinical findings and radiographic and MRI features in 16 dogs of various breeds. None of the dogs were trained as herding dogs and two were explicitly sporting dogs.

To the authors' knowledge, there are only two other reports describing gastrocnemius musculotendinopathy in the dog (1, 2). Based on the findings of these reports, it might be assumed that gastrocnemius musculotendinopathy is a disease occurring almost exclusively in herding or athletic dogs, with the Border Collie to be the breed most commonly affected.

Thus, the purpose of this study was to go beyond existing knowledge of the disease and emphasize that gastrocnemius musculotend-

Correspondence to:

Dr. med. vet. Susanne Kaiser
Department of Veterinary Clinical Science
Small Animal Clinic, Justus Liebig University
Frankfurter Straße 108
35392 Giessen
Germany
Phone: +49 641 993 8512
Fax: +49 641 993 8509
E-mail: Susanne.M.Kaiser@vetmed.uni-giessen.de

Vet Comp Orthop Traumatol 2016; 29: 515–521

<http://dx.doi.org/10.3415/Vcot-16-01-0015>

Received: January 22, 2016

Accepted: July 7, 2016

Epub ahead of print: October 14, 2016

Supplementary Material to this article is available online at <http://dx.doi.org/10.3415/Vcot-16-01-0015>.

Introduction

Musculotendinopathy of the lateral head of the gastrocnemius muscle is a rare disease described in herding or athletic dogs (1, 2).

Affected animals show chronic pelvic limb lameness and pain upon palpation of the lateral fabella, but no instability of the stifle joint. A history of trauma is usually not reported. Conservative treatment is the ther-

inopathy should be considered as a differential diagnosis for chronic hindlimb lameness in dogs regardless of athletic activity.

Materials and methods

Case selection

Medical records of 16 dogs that were presented to two referral centres (Small Animal Clinic, Justus Liebig University, Giessen, Germany and Tierklinik Lüneburg, Germany) from 2009 to 2014, and which were diagnosed with gastrocnemius musculotendinopathy, were reviewed. Therapy and outcome were evaluated by telephone questionnaire of owners, one to five years after diagnosis. A standard questionnaire developed for the study was used.

Radiographs and magnetic resonance imaging

Consensus review of the radiograph and MRI findings was performed by a board-certified radiologist (KP) and a first-year surgical resident (SK) using imaging software^a.

Radiographically, the fabellae and the stifle joint in general were examined for arthritic changes. The presence of joint effusion, subluxation of the tibia, abnormalities of the patella, and other changes were noted. A subjective scoring system (0 = no abnormality, 1 = mild changes, 2 = moderate changes, 3 = severe changes) was used for grading of the findings.

Magnetic resonance imaging of three patients was performed using a 1.0 Tesla scanner^b and in 13 patients using a 0.2 Tesla scanner^c. A solenoid coil was utilized. Slice thickness varied from 1 to 4 mm, adjusted to the size of the dog. Sagittal and dorsal slices were available in all cases, and transverse slices in 15 cases.

T1-weighted sequences pre- and post-intravenous application of contrast medium^{d,e}, T2, short tau inversion recovery



Figure 1 Mediolateral radiograph of the stifle of dog number 6. Note the moderate, mildly irregular, but smooth new bone formations surrounding the lateral fabella (arrow).

(STIR), and proton density-weighted (PD) sequences were performed. Magnetic resonance imaging was performed under general anaesthesia. Patients were positioned in lateral, dorsal, or sternal recumbency.

The images were assessed using a subjective scoring system. Changes in signal intensity – relative to the surrounding muscle – were scored as iso-, hyper-, or hypointense, or mixed (both hyper- and hypointense). The extent of altered signal and contrast enhancement of the lateral and medial head of the gastrocnemius muscle was scored as not present, mild, moderate, or severe. Similarly, alterations of the lateral and medial fabellae, pathologies of the cranial and caudal cruciate ligament or the lateral and medial meniscus, the presence of joint effusion, and subjective changes in the volume of the gastrocnemius muscle were evaluated.

Statistical analysis

Descriptive statistics were performed for signalment (age, weight, sex, and breed), duration of lameness, affected side, initial trauma, clinical and imaging findings, therapy, and outcome.

To detect statistical correlations between imaging variables, rank correlation analysis was performed using commer-

cially available software^f to determine Spearman's rank correlation coefficient (r_s) and the corresponding p-value. P-values ≤ 0.05 were considered to be statistically significant.

Results

Animals

From 2009 to 2014, 16 dogs were diagnosed with gastrocnemius musculotendinopathy using MRI; these included six Australian shepherds, two Bernese mountain dogs, and one of each of the following breeds: Labrador Retriever, Golden Retriever, Entlebucher Mountain Dog, Berger des Pyrénées, Cão da Serra de Aires, Aire-dale Terrier, Irish Soft Coated Wheaten Terrier, and mixed breed. Two of them were sporting dogs.

Six dogs were male (three neutered) and 10 were female (eight neutered). Mean age was seven years (range: 4–12 years) and mean body weight was 28.4 kg (range: 15–46.7 kg).

Dog number 12 had undergone a modified Maquet procedure surgery for a partial tear of the cranial cruciate ligament four months before diagnosis of gastrocnemius musculotendinopathy. An overview of the examined patients is given in ► Appendix Table 1 (Available online at www.vcot-online.com).

Anamnesis

Lameness before presentation was noted for up to one week in two dogs, up to two weeks in two dogs, up to four weeks in five dogs, and for more than four weeks in six dogs. In one dog, lameness was present for “several weeks” before presentation, but the exact duration was not noted. The left hindlimb was affected in nine dogs, and the right hindlimb in seven dogs. Initial trauma was noted in four dogs.

Thirteen dogs had been treated previously by the referring veterinarian. In seven cases, non-steroidal anti-inflammatory drugs were used.

^f SPSS software: IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Germany

^a OsiriX v.3.9.1.: Pixmeo Sarl, Geneva, Switzerland
^b Gyroscan Intera: Phillips, Hamburg, Germany
^c Vet-MR: Esaote, Köln, Germany
^d Gadolinium-DTPA Dotarem 0.01 mmol: Guerbet, Sulzbach (Taunus), Germany
^e Omniscan: GE-Healthcare, München, Solingen and Berlin, Germany

Table 1 Magnetic resonance imaging findings. A) Extension of the altered MRI signal of the gastrocnemius muscle, echogenicity of the altered signal, and uptake of contrast media. B) Further changes of the stifle joint.

A					
Lateral head of the gastrocnemius muscle	Extension of signal				
		No altered signal (n)	Mild (n)	Moderate (n)	Severe (n)
	T1, N = 16	0	10	6	0
	T2, N = 14	0	1	12	1
	STIR, N = 16	0	2	12	2
	PD, N = 4	0	2	2	0
	CM, N = 10	0	2	7	1
	Intensity				
		Isointense (n)	Hyper-intense (n)	Hypo-intense (n)	Hyper- and hypo-intense (n)
	T1, N = 16	0	12	3	1
T2, N = 14	0	12	1	1	
STIR, N = 16	0	15	1	0	
PD, N = 4	0	4	0	0	
Amount of contrast media uptake					
	No uptake (n)	Mild (n)	Moderate (n)	Severe (n)	
CM, N = 10	0	10	0	0	
Medial head of the gastrocnemius muscle	Extension of signal				
		No altered signal (n)	Mild (n)	Moderate (n)	Severe (n)
	T1, N = 16	14	1	1	0
	T2, N = 14	6	6	1	1
	STIR, N = 16	10	3	2	1
	PD, N = 4	3	1	0	0
	CM, N = 10	9	1	0	0
	Intensity				
		Isointense (n)	Hyper-intense (n)	Hypo-intense (n)	Hyper- and hypo-intense (n)
	T1, N = 16	14	2	0	0
T2, N = 14	6	7	1	0	
STIR, N = 16	10	5	1	0	
PD, N = 4	3	0	1	0	
Amount of contrast media uptake					
	No uptake (n)	Mild (n)	Moderate (n)	Severe (n)	
CM, N = 10	9	1	0	0	
B					
Changes of the lateral and medial fabella					
	No alteration	Mild	Moderate	Severe	
Lateral fabella N = 16	11	4	1	0	
Medial fabella N = 16	13	3	0	0	
Changes of the cranial and caudal cruciate ligament					
	No alteration	Partial tear	Complete tear		
Cranial cruciate ligament N = 16	14	2	0		
Caudal cruciate ligament N = 16	15	1	0		
Changes of the lateral and medial meniscus					
	No alteration	Mild	Moderate	Severe	
Lateral meniscus N = 16	15	1	0	0	
Medial meniscus N = 16	15	1	0	0	
Stifle joint effusion					
	Not present	Mild	Moderate	Severe	
Stifle joint effusion, N = 16	13	1	2	0	

N = number of dogs with available data; n = number of affected dogs.

Clinical findings

At initial presentation, 13 dogs were clinically lame and three were not. Thirteen patients showed signs of pain on examination of the affected stifle joint; in the remaining three patients, this was not recorded. Seven patients had palpable joint effusion and four did not; in five patients, this was not recorded. The cranial drawer test and tibia compression test were negative in 12 patients, positive in two, and not recorded in two.

Radiographs

In 14 dogs, mediolateral and craniocaudal radiographs were available. In dog number 4, no radiographs were obtained. In dog number 15, only a mediolateral radiograph was available.

N = number of dogs with available data; n = number of affected dogs.

MRI sequences: T1 = MRI sequence T1; T2 = MRI sequence T2; STIR: short-tau inversion recovery; PD = proton density; CM = contrast medium.



Figure 2 A) Pre- and B) post-contrast T1 weighted sagittal magnetic resonance image of the stifle of dog number 16. Extensive contrast uptake in the proximal aspect of the gastrocnemius muscle is visible (arrows).

Eight dogs had no abnormalities of the lateral fabella, while mild, moderate, and severe new bone formation was seen in four, two, and one dog, respectively (►Figure 1). Thirteen dogs showed no changes to the medial fabella, one dog showed mild changes, and one dog showed moderate changes. As to the stifle joint in general, 11 dogs had no arthritic changes, three had mild arthritis, and one had moderate arthritis. Two dogs showed mild radio-

graphic signs of joint effusion, and one showed moderate signs. Subluxation of the tibia was not noted in any of the dogs. Alterations of the patella, such as the position on the lateral ridge of the femoral trochlea, were noted in three dogs.

Magnetic resonance imaging

The results of the MRI evaluations are summarized in ►Table 1.



Figure 3 T2 weighted sagittal magnetic resonance image of the stifle of dog number 16. The proximal aspect of the gastrocnemius muscle shows a diffuse and partially ill-defined moderate hyperintensity (arrows).



Figure 4 Short tau inversion recovery in sagittal orientation of the stifle of dog number 16. The proximal aspect of the gastrocnemius muscle shows a diffuse and well-defined severe hyperintensity (arrows).

With T1 imaging, before application of the contrast medium, a hyperintense signal was found in the lateral head of the gastrocnemius muscle in 12 dogs (►Figure 2A). The signal was hypointense in three dogs, and both hyper- and hypointense areas were found in one dog. The extent of the signal was mild or moderate. Fourteen dogs showed no altered signal in the medial head of the gastrocnemius muscle. In two dogs, a hyperintense signal of mild or moderate extent was found.

In 10 patients, MRI was also performed following intravenous application of a contrast medium (►Figure 2B). In all cases, mild uptake of the contrast medium was visible in the lateral head of the gastrocnemius muscle. The extent of contrast medium uptake was mild in two cases, moderate in seven cases, and severe in one case. In the medial head, mild uptake of the contrast medium was found in only one dog.

With T2 weighted imaging, 12 patients showed hyperintense signal in the lateral head of the gastrocnemius muscle (►Figure 3). One patient showed a hypointense signal, and another showed both hyper- and hypointense signal. The extent of the signal was mild in one, moderate in 12, and severe in one case(s). In the medial head, seven dogs showed a hyperintense signal, and one showed a hypointense signal.

A fat-suppressed short tau inversion recovery (STIR) sequence was performed in all patients, revealing a generally hyperintense signal with moderate extent in the lateral head (►Figure 4). In the medial head, the STIR sequence revealed hyperintensity in five dogs and hypointensity in one dog.

Four patients were also examined using a proton density (PD) sequence, which revealed hyperintense signal of mild-to-moderate extent in the lateral head of the gastrocnemius muscle. In the medial head, one dog showed a hypointense signal in the PD sequence.

No changes in the volume of the gastrocnemius muscles were noted. A partial tear of the cranial cruciate ligament was found in two dogs, and alterations of the caudal cruciate ligament and of the medial or lateral meniscus were each found in one dog (►Table 1B).

► Table 2 shows the results of the rank correlation analysis that detected correlations between imaging variables.

Therapy

Owners were advised to restrict exercise for their dogs for various periods of time, to administer analgesics, and to perform physiotherapy. The following data concerning therapies performed at home were verified via telephone contact with the owners. Two owners (of dog numbers 1 and 2) could not be contacted via telephone; follow-up data were therefore not available. In dog number 14, a tibial tuberosity advancement was performed because of suspected rupture of the cranial cruciate ligament. Consequently, only the data concerning clinical examination and diagnostic imaging findings, but not the follow-up data, were included in the statistical evaluation.

One dog rested for up to one week, two dogs for up to four weeks, seven dogs for up to six weeks, and three dogs for more than six weeks. Seven dogs were treated with non-steroidal anti-inflammatory drugs, one with metamizole, and one with methocarbamol. Four dogs received no treatment with oral analgesics. Three owners administered oral analgesics as needed, and five owners administered them over specific periods of time (five days for one dog, and two to six weeks for four dogs). In five dogs, the exact time span of oral analgesics administration could not be evaluated. Professional physiotherapy was performed in nine dogs.

Outcomes

According to telephone consultations, 11 dogs returned to normal function, including canine sports, with no recurrence noted. Dog number 7 showed no improvement and was euthanatized 10 months after MRI of the stifle joint, but without further diagnostic evaluation, due to suspected concurrent intervertebral disc disease. Dog number 12 had previously undergone a modified Maquet procedure surgery four months before being diagnosed with gastrocnemius musculotendin-

Table 2 Bilateral positive correlations between imaging variables detected by rank correlation analysis.

Variable x	Variable y	Spearman CC p-value Number
MRI: Lateral head of the gastrocnemius muscle, extension of signal, T2	MRI: Lateral head of the gastrocnemius muscle, extension of signal, STIR	0.817 0.000 14
MRI: Lateral head of the gastrocnemius muscle, extension of signal, STIR	MRI: Medial head of the gastrocnemius muscle, extension of signal, T2	0.606 0.022 14
MRI: Lateral head of the gastrocnemius muscle, extension of signal, STIR	MRI: Lateral head of the gastrocnemius muscle, extension of signal, T1	0.516 0.041 16
MRI: Medial head of the gastrocnemius muscle, extension of signal, T2	MRI: Medial head of the gastrocnemius muscle, extension of signal, STIR	0.619 0.018 14
MRI: Medial head of the gastrocnemius muscle, extension of signal, STIR	MRI: Joint effusion	0.613 0.012 16
MRI: Medial head of the gastrocnemius muscle, amount of contrast media uptake	MRI: Medial head of the gastrocnemius muscle, echogenicity, T1	1.000 0.000 10
MRI: Alterations of the lateral fabella	MRI: Joint effusion	0.730 0.001 16
Radiographs: Alterations of the lateral fabella	MRI: Joint effusion	0.615 0.015 15
Radiographs: Alterations of the lateral fabella	MRI: Alterations of the lateral fabella	0.645 0.009 15
Radiographs: Joint effusion	MRI: Joint effusion	0.661 0.007 15

CC = correlation coefficient; MRI = magnetic resonance imaging; STIR = short-tau inversion recovery

opathy, and it continued to show intermittent lameness. Dog number 14 had tibial tuberosity advancement surgery, and it showed marked improvement but did not become completely free of lameness; this dog was euthanatized 12 months later due to unrelated disease. Two dogs (numbers 1 and 2) were lost to follow-up.

Discussion

According to previous reports, musculotendinopathy of the gastrocnemius muscle is a disease occurring in athletic dogs, with Border Collies being the breed most com-

monly affected (1, 2). The disease also occurs in humans, most commonly due to sudden stop-and-go movement or turns during athletic activity (5–7).

In contrast, we diagnosed the disease in 16 dogs aged from four to 12 years and of various middle-to-large breeds, most of which were family dogs and not used for canine sport activities.

Inciting trauma was not observed in most of our patients. Palpation of the stifle joint was usually painful, but instability was not present in most cases. These findings are in accordance with the other reports in the literature (1, 2). Additionally, seven of our patients had palpable joint effusion.

Myotendinous strain due to excessive tension resulting in gastrocnemius musculotendinopathy can be acute or chronic (2). Four of our patients showed lameness for up to one or two weeks, and 12 were lame for a longer period of time.

Osteophyte formation at the lateral fabella and mineralizations at the origin of the gastrocnemius muscle have been described in affected dogs (1, 2). We found corresponding changes in seven dogs. Osteophyte formation at the medial fabella or arthritic changes of the stifle joint in general were uncommon among the dogs of this study, with only two and four dogs affected, respectively. Using MRI, mild or moderate alterations of the lateral fabella were found in five dogs, and mild alterations of the medial fabella were found in three dogs (► Table 1B). These mineralizations or osteophyte formations indicated chronicity of the process (2). Periosteal reactions on the caudal aspect of the femur and the fabellae develop due to repeated microtrauma and avulsion of tendon fibres (8, 9). Dystrophic calcification due to mechanical stress can occur in the muscle next to the fabellae (8).

Magnetic resonance imaging examination of the gastrocnemius muscle revealed signs of inflammatory oedematous change that were subacute to chronic. In the T1 sequence, we found a hyperintense signal in the lateral head of the gastrocnemius muscle in 12 dogs, and a hypointense or a both hyper- and hypointense signal in four. Stahl and colleagues also found hyperintense T1 signal intensity in nine dogs (2). In contrast, Fiedler and colleagues described hypointense areas at the origin of the lateral gastrocnemius head (1). An explanation for this difference in signal intensity is stage of the disease. T1 hypointensity can indicate oedematous change, and thus represents a subacute process (1, 10). On the other hand, T1 hyperintensity can be due to fat cell infiltration, and thus represents a chronic process (1, 10). As most of the patients in the present study had a history of chronic lameness, the clinical findings fit well with the MRI findings.

As in cases described by others, we found uptake of contrast medium in the lateral head of the gastrocnemius muscle (1, 2). This can be interpreted as an active

process, namely, a sterile inflammatory process (1, 2).

In the T2, STIR, and PD sequences, we generally found a hyperintense signal in the lateral head of the gastrocnemius muscle. This is compatible with the findings of other authors, and can be interpreted as oedematous change (1, 2, 10).

Peracute or chronic bleeding into a muscle is a potential differential diagnosis for hyperintensity in fluid-sensitive sequences and hypointensity in T1. If differentiation is necessary, a T2* sequence can be used (1). Another differential diagnosis for gastrocnemius musculotendinopathy due to myotendinous strain is muscle contusion secondary to direct trauma, leading to subcutaneous fluid accumulation. Differentiation via MRI might be difficult, as both conditions result in an increased signal intensity in fluid-sensitive sequences (2, 10).

The medial head of the gastrocnemius muscle was also examined. In individual patients, hyper- to hypointense signal intensity could be detected in all sequences performed. Uptake of the contrast medium was found in one dog. It was concluded that altered signal behaviour was not limited to the lateral head of the gastrocnemius muscle, and therefore that the medial head should be evaluated, as it can also be affected by the disease (although generally to a lesser extent). Rank correlation analysis revealed several correlations between the extent of the altered signal in different sequences. Similarly, positive correlations were found between the signal intensity in T1 sequences and the degree of enhancement on post-contrast sequences (► Table 2). Thus, not all sequences performed in this study have to be carried out in order to diagnose gastrocnemius musculotendinopathy. If gastrocnemius musculotendinopathy is suspected in a clinical patient, we recommend a combination of T1- pre- and post-contrast administration and T2-weighted sequences, completed by a fat-suppressed sequence such as STIR to highlight changes in subtle cases.

Joint effusion detected by MRI was significantly correlated with alterations of the lateral fabella (► Table 2) and can be interpreted as evidence for a fulminant course of disease. Importantly, no negative corre-

lations were found between patient outcome and recurrence with clinical, radiographic, or MRI features.

Gastrocnemius musculotendinopathy develops because of repeated myotendinous strain to the origin of the gastrocnemius muscle (4). In general, musculotendinopathies can be categorized as stretch injuries (grade I), partial tears (grade II), or complete tears (grade III). They can be classified clinically on the basis of the degree of muscle function loss or the extent of the lesion on MRI examination (11, 12). The dogs in this report showed lesions of grades I–II, which is in accordance with the results of others (1, 2).

As pathology of the cranial cruciate ligament and concurrent meniscal disease are differential diagnoses for gastrocnemius musculotendinopathy, MRI images were also investigated for abnormalities of these structures (► Table 1B) (1).

An exact diagnosis of lameness is essential, as the appropriate therapy differs tremendously, with surgical procedures like tibia plateau levelling osteotomy or tibial tuberosity advancement being most commonly performed in cases of a ruptured cranial cruciate ligament (13).

Another differential diagnosis for gastrocnemius musculotendinopathy is avulsion of the lateral, medial, or both heads of the gastrocnemius muscle (9, 14, 15). In this case, dogs show severe lameness and often a plantigrade stance, and swelling can also be noted (9, 15).

As mentioned above, the therapy recommended to our patients consisted of exercise restriction, administration of analgesics like non-steroidal anti-inflammatory drugs, and professional physiotherapy. A limitation of our study is that the time span of restricted exercise and administration of analgesics varied, but most dogs for which follow-up was available rested for six weeks or longer. No recurrence of lameness and return to full function, including athletic activities, was noted in 11 out of 13 patients, for which follow-up was available (84.6%). These results are in accordance with other cases described in the veterinary literature (1, 2). In humans, a recurrence rate of only 0.7% after conservative therapy is reported (6). This study, however, included 720 human patients; thus, the recur-

rence rate cannot be directly compared to that in our rather small study population.

Obviously, the relatively small number of patients and the retrospective study design are limitations of the present study. As patients from two referral centres were included, different MRI imaging protocols were used, and images were obtained by two different magnetic resonance scanners. Patient anamnesis was heterogeneous, and details of treatment protocols varied between individuals. Due to these limitations, only descriptive statistical evaluations were possible. Altogether, further studies are necessary to overcome these restrictions.

In conclusion, gastrocnemius musculotendinopathy is a potential diagnosis in dogs with chronic hindlimb lameness. The most important differential diagnosis is cranial cruciate ligament rupture. Dogs of various middle-to-large breeds can be affected, and athletic activity is not a necessary cause. Both the lateral and the medial head of the gastrocnemius muscle can be involved, with emphasis on the lateral head. MRI shows oedematous changes and uptake of contrast agents in the region of the origin of the gastrocnemius muscle.

Conservative treatment generally results in return to full function.

Conflict of interest

The authors confirm that they do not have any conflict of interest.

References

1. Fiedler AM, Amort KH, Bokemeyer J, et al. Musculotendinopathy of the gastrocnemius muscle in a Labrador Retriever. A case report. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere* 2013; 41: 349–354.
2. Stahl C, Wacker C, Weber U, et al. MRI features of gastrocnemius musculotendinopathy in herding dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 2010; 51: 380–385.
3. Hermanson JW. The muscular system: Muscles of the pelvic limb. In: Evans HE, Miller ME, editors. *Miller's Anatomy of the Dog*. 4th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2013. pg. 254–276.
4. Stevens MA, El-Khoury GY, Kathol MH, et al. Imaging features of avulsion injuries. *Radiographics* 1999; 19: 655–672.
5. Jacobson JA, Miller BS, Morag Y. Golf and racquet sports injuries. *Semin Musculoskelet Radiol* 2005; 9: 346–359.
6. Millar AP. Strains of the posterior calf musculature (“tennis leg”). *Am J Sports Med* 1979; 7: 172–174.
7. Koulouris G, Ting AY, Jhamb A, et al. Magnetic resonance imaging findings of injuries to the calf muscle complex. *Skeletal Radiol* 2007; 36: 921–927.
8. Dawid N, Mayrhofer E. Radiological diagnosis of insertion-tendopathies of the stifle joint in dogs. *Wien Tierärztl Mschr* 1992; 79: 171–177.
9. Robinson A. Atraumatic bilateral avulsion of the origins of the gastrocnemius muscle. *J Small Anim Pract* 1999; 40: 498–500.
10. May DA, Disler DG, Jones EA, et al. Abnormal signal intensity in skeletal muscle at MR imaging: patterns, pearls, and pitfalls. *Radiographics* 2000; 20 Spec No: S295–315.
11. Bencardino JT, Rosenberg ZS, Brown RR, et al. Traumatic musculotendinous injuries of the knee: diagnosis with MR imaging. *Radiographics* 2000; 20 Spec No: S103–120.
12. Palmer WE, Kuong SJ, Elmadbouh HM. MR imaging of myotendinous strain. *Am J Roentgen* 1999; 173: 703–709.
13. Christopher SA, Beetem J, Cook JL. Comparison of long-term outcomes associated with three surgical techniques for treatment of cranial cruciate ligament disease in dogs. *Vet Surg* 2013; 42: 329–334.
14. Mueller MC, Gradner G, Hittmair KM, et al. Conservative treatment of partial gastrocnemius muscle avulsions in dogs using therapeutic ultrasound – a force plate study. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2009; 22: 243–248.
15. Ridge PA, Owen MR. Unusual presentation of avulsion of the lateral head of the gastrocnemius muscle in a dog. *J Small Anim Pract* 2005; 46: 196–198.

Muskulotendinopathie des Musculus gastrocnemius bei einem Labrador Retriever

Ein Fallbericht

A. M. Fiedler; K. H. Amort; J. Bokemeyer; M. Kramer

Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Kleintiere, Chirurgie, der Justus-Liebig-Universität Gießen

Schlüsselwörter

Hintergliedmaßenlahmheit, Knie, Überdehnung, Sport, laterale Fabel-la, Magnetresonanztomographie, Hund

Zusammenfassung

Die Muskulotendinopathie des Musculus (M.) gastrocnemius stellt eine seltene Erkrankung des Ursprungs dieses Muskels dar, die durch eine chronische Überbelastung des Muskel-Sehnen-Übergangs beim Sporteinsatz entsteht und zumeist bei Hütehunden beschrieben wurde. Klinisch zeigen die Patienten eine chronische Hinterhandlahmheit sowie Schmerzhaftigkeit bei Druck auf die laterale Fabel-la. Eine Kniegelenkinstabilität fehlt. Radiologische Befunde (osteophytäre Neufor-mationen im Bereich des Muskelursprungs und der lateralen Fabel-la) geben ebenfalls Hinweise auf das Vorliegen der Erkrankung. In der magnetresonanztomographischen Untersuchung zeigen sich Ödeme im Bereich des Ursprungs des lateralen Gastrocnemiuskopfes und eine Anreicherung von Kontrastmittel nach intravenöser Applikation. Die Muskulotendinopathie des M. gastrocnemius hat bei konsequenter konservativer Therapie (Ruhhaltung, Gabe nichtsteroidaler Antiphlo-gistika und Physiotherapie) eine gute Prognose. Der Fallbericht be-schreibt die klinischen Befunde, bildgebende Diagnostik (Röntgen und Magnetresonanztomographie) sowie die Therapie und das Langzeit-ergebnis dieser Erkrankung bei einem sportlich geführten Labrador Retriever.

Key words

Hindlimb lameness, stifle, myotendinous strain, athletic, lateral fabel-la, magnetic resonance tomography, dog

Summary

Musculotendinopathy at the origin of the gastrocnemius muscle is a rare disease mostly described in herding dogs. The etiology is based on repeated myotendinous strain of the muscle in athletic dogs. Clinically, the patient displays chronic pelvic limb lameness and pain at the lateral fabella during palpation of this area. There is no instability of the stifle present. Radiographic findings (osteophyte formation at the origin of the muscle and the lateral fabella) support the potential diagnosis. Magnetic resonance tomography shows edematous changes and enhancement after intravenous application of contrast agent in the area of the origin of the lateral gastrocnemius head. With conservative treatment (i.e. leash confinement, NSAID application and physiotherapy) the prognosis is good. This case report describes clinical findings, diagnostic imaging, therapy and long-term outcome of an athletic Labrador Retriever presented with this disease.

Korrespondenzadresse

Angelika M. Fiedler
Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Kleintiere (Chirurgie)
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Frankfurter Straße 108
35392 Gießen
E-Mail: a.m.fiedler@gmx.de

Musculotendinopathy of the gastrocnemius muscle in a Labrador Retriever. A case report

Tierärztl Prax 2013; 41 (K): 349–354

Eingegangen: 10. Juli 2012

Akzeptiert nach Revision: 19. November 2012

Einleitung

Die Muskulotendinopathie des Musculus (M.) gastrocnemius stellt eine Erkrankung der Muskel-Sehnen-Einheit dar, die mit chronischer Hintergliedmaßenlahmheit und Schmerzhaftigkeit im Bereich des Muskelursprungs einhergeht (18). Verletzungen, die den Ursprung des M. gastrocnemius betreffen, sind Avulsionen der Sehnen vom Femur (11, 15, 19). Beim Hund treten vollständige oder partielle Avulsionen selten auf. Häufig handelt es sich um die Folge akuter Traumata (12, 15), doch kommen sie auch als chroni-

scher Prozess im Sinne einer Muskulotendinopathie zumeist bei Hütehunden vor (16, 18). In der überwiegenden Zahl der Fälle ist der laterale Kopf des M. gastrocnemius betroffen (9, 11, 12, 15, 18) seltener der mediale (9) oder beide (16).

Im Folgenden wird der Fall eines Labrador Retrievers mit einer Muskulotendinopathie des M. gastrocnemius im Hinblick auf die klinischen Symptome, die Befunde aus Röntgen- und MRT-Untersuchung sowie die Therapie vorgestellt. Weiterhin werden die Befunde einer Kontrolluntersuchung des Patienten (inklusive MRT) 8,5 Monate nach Diagnosestellung beschrieben.



Abb. 1
Röntgenbilder des linken Kniegelenks im mediolateralen (a) und kraniokaudalen (b) Strahlengang; periartikuläre Mineralisation kaudal am distalen Femur im Bereich des Ursprungs des lateralen Gastrocnemiuskopfes (Pfeilspitze); Nebenbefund (Abb. 1a): Patellasporn (weißer Pfeil). (Mit freundlicher Genehmigung der Kleintierpraxis Lechtermannshof)

Fig. 1
Mediolateral (a) and craniocaudal (b) radiograph of the left stifle: periarticular mineralization at the origin of the gastrocnemius muscle (arrow head); incidental finding (Fig. 1a): patellar spur (white arrow). (Courtesy of Kleintierpraxis Lechtermannshof).

Fallbeschreibung

Patient und Anamnese

Eine 9 Jahre alte, kastrierte Labrador-Retriever-Hündin mit 23 kg Körpergewicht zeigte laut Vorbericht seit 3 Monaten eine intermittierende Lahmheit der linken Hintergliedmaße. Das Tier war aktiver Rettungshund mit regelmäßigem Training und Einsätzen im In- und Ausland bei Flächen- und Trümmerarbeit. Auf Physiotherapie und Schmerzmittelgabe über 10 Tage stellte sich keine Besserung ein.

Klinische Untersuchung

Bei der allgemeinen klinischen Untersuchung präsentierte sich die Hündin sehr aufgeregt mit einer Körperinnentemperatur von 39,5 °C. Alle weiteren Vitalparameter befanden sich im Referenzbereich. Bei der klinisch-orthopädischen Untersuchung zeigte der Patient eine Lahmheit ersten Grades im Schritt hinten links sowie eine verkürzte Vorführphase dieser Gliedmaße. Das linke Knie war schmerzhaft bei Manipulation, vor allem bei maximaler Streckung und bei Druck auf die laterale Fabella. Ferner bestand eine geringgradige Streckhemmung. Schubladen- und Tibiakompressionstest waren negativ. Bei maximaler Rotation des rechten Hüftgelenks reagierte die Hündin ebenfalls unwillig.

Röntgenuntersuchung

Da eine Woche alte Röntgenaufnahmen der überweisenden Haus-tierarztpraxis von beiden Kniegelenken, der Brust- und Lendenwirbelsäule, des Beckens sowie der rechten und linken Pfote vorlagen, wurde auf eine Röntgenuntersuchung verzichtet. Das linke Kniegelenk wies röntgenologisch periartikuläre Mineralisationen kaudal am distalen Femur im Bereich des Ursprungs des lateralen Kopfes des M. gastrocnemius auf (► Abb. 1). Am dorsalen Scheitelpunkt der Patella befand sich eine geringgradige hakenförmige Ausziehung im Sinne eines Patellasporns. Die Röntgenbilder des

rechten Kniegelenks ließen ähnliche Befunde erkennen. Proximal und distal der lateralen Fabella zeigten sich mineraldichte unregelmäßige, aber glatt begrenzte, runde Strukturen. Im Bereich des Ursprungs des lateralen Gastrocnemiuskopfes am kaudalen Femur waren Enthesiophyten erkennbar. Am dorsalen Scheitelpunkt der Patella zog ebenfalls ein Patellasporn nach proximal. Auf der Beckenaufnahme im ventrodorsalen Strahlengang fielen rechtsseitig geringgradige osteophytäre Zubildungen am Femurkopf-Femurhals-Übergang sowie eine angedeutete Morgan-Linie auf.

Die Veränderungen im Bereich des Sesambeins wurden als Hinweis auf eine chronische Muskulotendinopathie des M. gastrocnemius angesehen. Zudem bestand rechts eine beginnende Koxarthrose.

MRT-Untersuchung

Die MRT fand mit einem geschlossenen Hochfeldsystem (Philips, Gyroscan 1 Tesla) und einer Oberflächenempfangsspule statt. Zur Untersuchung des linken Kniegelenks und der umgebenden Strukturen wurde der Patient in Seitenlage verbracht und die Gliedmaße in geringgradiger Streckstellung gelagert. Die Untersuchung umfasste T2-gewichtete sagittal und transversal orientierte Sequenzen, eine dorsal und sagittal orientierte fettunterdrückte Sequenz (STIR, Short Tau Inversion Recovery Sequence) sowie eine protonendichtegewichtete dorsal orientierte Sequenz zur Beurteilung der knöchernen Strukturen und der Kreuzbänder. T1-gewichtete Aufnahmen in sagittaler und transversaler Schnittführung erfolgten vor und nach intravenöser Kontrastmittelapplikation (Gadolinium-DTPA Dotarem® 0,01 mmol; Guerbet).

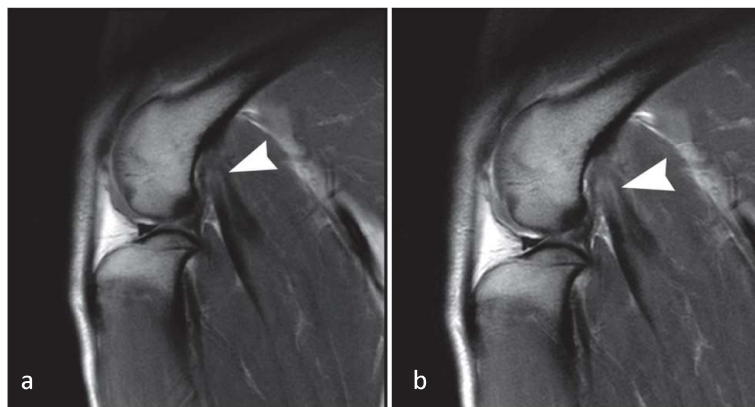
In T1-gewichteten Bildern stellten sich hypointense unregelmäßige Areale im Bereich des Ursprungs des lateralen Kopfes des M. gastrocnemius und des entsprechenden Sesambeins dar (► Abb. 2a). Im proximalen Anteil des lateralen Gastrocnemiuskopfes zeigte sich eine heterogene Kontrastmittelanreicherung (► Abb. 2b, ► Abb. 3a). In den T2-gewichteten und fettunterdrückten Sequenzen war am Ansatz des lateralen Kopfes des

Abb. 2

Magnetresonanztomographie des linken Kniegelenks, Sagittalschnitt in einer T1-gewichteten Sequenz über den lateralen Gastrocnemiuskopf. a) Streifige, hypointense, nach distal unregelmäßig auslaufende Areale im Bereich des Muskelursprungs (Pfeilspitze). b) Nach Kontrastmittelapplikation deutliche Kontrastmittelanreicherung in diesem Bereich.

Fig. 2

Magnetic resonance image of the left stifle, T1-weighted sagittally oriented sequence showing the lateral head of the gastrocnemius muscle. a) A hypointense striated area at the origin of the gastrocnemius muscle (arrow head) which is ill-defined in its distal area. b) Marked contrast enhancement in this region after administration of contrast agent.



M. gastrocnemius ein schlecht begrenztes hyperintenses Areal zu erkennen, das mehrere Zentimeter nach distal bis auf Höhe der proximalen Tibia zog (► Abb. 4a). Der Verlauf der Signalintensität folgte dem Verlauf der Gastrocnemiusmuskulatur. Die Sesambeine zeigten sich in allen Sequenzen signallos.

Aufgrund dieser Befunde bestand der Verdacht auf ein Muskelödem infolge eines Entzündungsprozesses. Als Differenzialdiagnose für die Läsion, die neben einer Hyperintensität in flüssigkeitssensitiven Sequenzen ein hypointenses Signal in T1-gewichteten Sequenzen aufweist, sollten perakute oder chronische Einblutungen in die Muskulatur genannt werden.

Diagnose und Therapie

Anhand der erhobenen Befunde wurde die Diagnose einer Muskulotendinopathie Grad I bis II des lateralen Kopfes des Musculus gastrocnemius gestellt. Die geringgradige Koxarthrose wurde als Nebenbefund eingestuft.

Es erging der Rat zur konservativen Therapie in Form von Schonung des Hundes (Leinenzwang bei kurzen Spaziergängen von 10–15 Minuten, Unterbrechung des Trainings- bzw. Arbeitseinsatzes) für 6 Wochen. Im gleichen Zeitraum sollte ein nicht-steroidales Antiphlogistikum (Firocoxib, 5 mg/kg einmal täglich;

Previcox®; Merial) verabreicht und eine professionell angeleitete Physiotherapie durchgeführt werden. Anschließend sollte die Belastung langsam über mehrere Monate gesteigert werden.

Weiterer Verlauf

Die Hündin wurde 8,5 Monate nach Therapiebeginn zu einer Zahnbehandlung in Narkose vorgestellt und die Besitzer stimmten einer erneuten orthopädischen und MRT-Untersuchung zu. Laut Besitzer zeigte das Tier ein sehr gutes Allgemeinbefinden sowie eine für sein Alter überdurchschnittliche Bewegungslust. Eine Lahmheit sei seit Beendigung der Schonung nicht mehr aufgetreten.

In der orthopädischen Untersuchung ließ sich keine Lahmheit feststellen. Im Bereich des linken Kniegelenks war lediglich bei starkem Druck auf die laterale Fabella eine Unwilligkeit auszulösen, ansonsten blieb die Untersuchung ohne auffällige Befunde. Die Röntgenaufnahmen der Kniegelenke zeigten, bis auf eine Glättung der periartikulären Mineralisationen im Bereich des Ursprungs des M. gastrocnemius und der lateralen Fabella beidseits, keine Veränderungen zu den Voraufnahmen (► Abb. 5).

Bei der MRT-Untersuchung präsentierte sich der proximale Anteil des M. gastrocnemius auf der linken Seite in allen Se-

Abb. 3

Magnetresonanztomographie des linken Kniegelenks, Transversalschnitt in einer T1-gewichteten Sequenz nach intravenöser Gabe von Kontrastmittel. a) Deutliche Kontrastmittelaufnahme am Ursprung des lateralen Gastrocnemiuskopfes (Pfeilspitze) als Hinweis auf einen aktiven Prozess. b) Kontrolluntersuchung 8,5 Monate später: keine Kontrastmittelaufnahme nachweisbar, das Areal stellt sich hypointens dar (Pfeilspitze).

Fig. 3

Magnetic resonance image of the left stifle, T1-weighted transverse sequence after intravenous administration of contrast agent. a) Marked contrast enhancement at the lateral head of the gastrocnemius muscle in this region (arrow head) indicating an inflammatory process. b) Follow-up examination after 8.5 months: no contrast enhancement, the area presents as hypointense (arrow head).



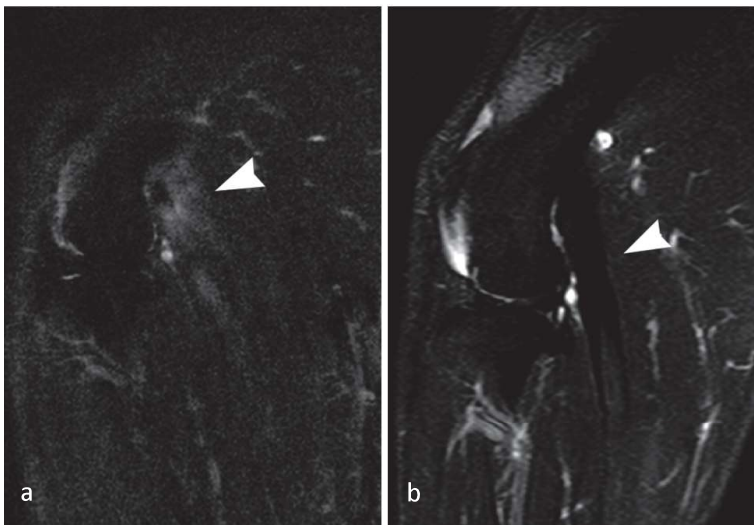


Abb. 4
Magnetresonanztomographie des linken Kniegelenks, Sagittalschnitt in einer STIR-(short tau inversion recovery)-Sequenz. a) Schlecht begrenztes hyperintenses Areal am Ursprung des lateralen Kopfes des M. gastrocnemius, das mehrere Zentimeter nach distal zieht und dem Muskelfaserverlauf folgt (Pfeilspitze); Verdacht auf Ödem in diesem Bereich. b) Kontrolluntersuchung 8,5 Monate später: Areal stellt sich hypointens im Sinne eines ausgeheilten Entzündungsprozesses und einer fortgeschrittenen Fibrosierung dar (Pfeilspitze).

Fig. 4
Magnetic resonance image of the left stifle, sagittally oriented STIR (short tau inversion recovery) sequence. a) At the origin of the gastrocnemius muscle ill-defined hyperintense area following the course of the gastrocnemius muscle fibers several centimeters distally, representing an edema (arrow head). b) Follow-up examination after 8.5 months: hypointense signal following the course of the gastrocnemius muscle fibers consistent with a completed inflammatory process and advanced fibrosis (arrow head).

quenzen hypointens. Dieser Bereich war nach distal schlecht begrenzt und ging im mittleren Drittel des Muskels in ein Areal mit einer für Muskulatur physiologischen Intensität über. Auch in der fettgesättigten Sequenz ließ sich im Vergleich zu den Voruntersuchungen keine Hyperintensität mehr nachvollziehen (▶ Abb. 4b). Eine Kontrastmittelanreicherung war nicht zu erkennen (▶ Abb. 3b). Die Befunde sprachen für eine sekundäre Fibrosierung im Bereich des proximalen Muskel-Sehnen-Übergangs des M. gastrocnemius auf der linken Seite als Zustand nach ausgeheilter Muskulotendinopathie.

Diskussion

Der Begriff Muskulotendinopathie beschreibt eine unspezifische pathologische Veränderung der Muskel-Sehnen-Einheit. Beim vorgestellten Patienten bestand eine chronische partielle Avulsion des Ursprungs des M. gastrocnemius, deren radiologische Veränderungen den Insertionsdesmopathien zugeordnet werden kön-

nen (2, 18). Die Ursache stellt eine wiederholte Überbeanspruchung des Muskels durch kraftvolle Kontraktionen bei gleichzeitiger Dehnung dar (exzentrische Kontraktion). Besonders häufig sind Muskeln betroffen, die mehrere Gelenke überspannen, oberflächlich liegen und viele Typ-II-Muskelfasern enthalten. Zu diesen Muskeln gehören der M. gastrocnemius, der M. biceps brachii und die kaudale Oberschenkelmuskulatur (1, 6). Nach klinischem Erscheinungsbild und Funktionsverlust können Muskulotendinopathien in Überdehnung (Grad I), Teilruptur (Grad II) und vollständige Ruptur (Grad III) eingeteilt werden (1). Der vorliegende Fall stellt eine Muskulotendinopathie Grad I bis II im Sinne einer chronischen Überdehnung mit Riss einzelner Muskelfasern dar.

Beim Menschen treten Avulsionen dieses Muskels hauptsächlich im Zusammenhang mit Sportarten auf, die schnelle Beschleunigungen, plötzliche Stopps und Drehungen erfordern (19). So wird die Ruptur des medialen Kopfes des M. gastrocnemius als so genanntes „Tennisbein“ bei Personen mittleren Alters als Tennis- oder Golfverletzung beobachtet (1, 3, 7–9).

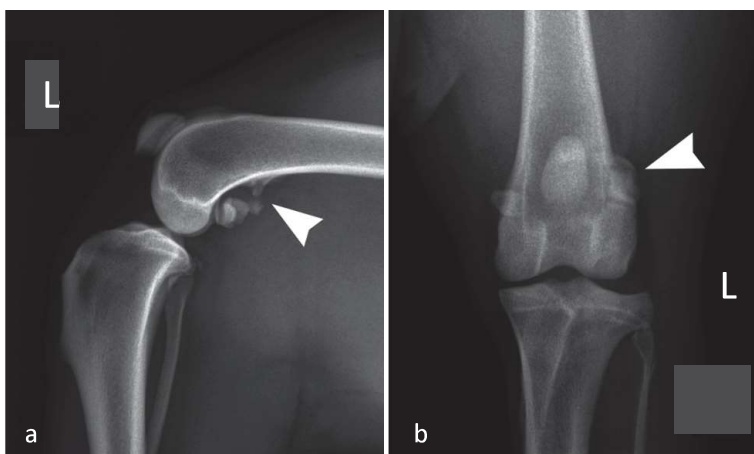


Abb. 5
Kontrollröntgenbilder des linken Kniegelenks im mediolateralen (a) und kraniokaudalen (b) Strahlengang 8,5 Monate nach der Erstvorstellung; periartikuläre Mineralisationen im Bereich des Ursprungs des M. gastrocnemius und der lateralen Fabella (Pfeilspitze) geglättet; (vgl. Abb. 1)

Fig. 5
Mediolateral (a) and craniocaudal (b) follow-up radiographs of the left stifle 8.5 months after the first presentation. The periarticular mineralization at the origin of the lateral gastrocnemius muscle and the lateral fabella (arrow head) are smoother (compare to Fig. 1).

Von Verletzungen des Muskelurprungs sind meist Sport- und Rennhunde betroffen (20). Stahl et al. (18) beschrieben 2010 neun Fälle von Muskulotendinopathie des Caput laterale des M. gastrocnemius bei sportlich genutzten Hunden der Rassen Border Collie und Australian Shepherd. Die deutliche Überrepräsentation von Hütehunderassen und vor allem Border Collies konnten wir in unserem Patientengut der letzten Monate nicht nachvollziehen. Im Zeitraum von April bis September 2011 wurden in unserer Klinik vier Hunde mit einem klinischen und radiologischen Verdacht auf eine Muskulotendinopathie des M. gastrocnemius behandelt. Bei den zum Zeitpunkt der Vorstellung 4–9 Jahre alten Hunden handelte es sich um jeweils einen Labrador Retriever (der hier vorgestellte Patient), Golden Retriever, Border Collie und Rottweiler. Mit Ausnahme des Rottweilers wurden die Hunde sportlich genutzt, wobei die Einsatzgebiete differierten (Agility, Hütesport, Rettungseinsätze). Die Theorie, dass die Erkrankung durch das bei Hütehunderassen vorherrschende Bewegungsmuster und biomechanische Gegebenheiten bedingt ist, lässt sich zumindest diskutieren. Die sportliche Nutzung eines mittelgroßen bis großen Hundes ist aber als prädisponierender Faktor zu vermuten.

Während des Trainings entstehen eine chronische Überbelastung und wiederholte Mikrotraumen des Muskelurprungs. Die Sehnenfasern werden überdehnt, einzelne reißen (19). Die Patienten werden, wie auch in unserem Fall, ohne beobachtetes Trauma mit einer chronischen Lahmheit vorgestellt (18). Typischerweise ist die Palpation des Kniegelenks schmerzhaft (9, 15, 18), wodurch es zur Fehldiagnose des beim Hund wesentlich häufiger auftretenden Kreuzbandrisses kommen kann. Die Schmerzhaftigkeit lässt sich allerdings bei korrekter klinischer Untersuchung meist im Bereich der betroffenen Fabella kaudoproximal des Kniegelenks lokalisieren. Eine verstärkte Gelenkfüllung sowie eine Instabilität des Kniegelenks fehlen dagegen (9, 15, 18). Differenzialdiagnostisch kommt eine akute, vollständige Avulsion des M. gastrocnemius infrage. Hier ist der betroffene Bereich geschwollen. Bei der vollständigen Avulsion beider oder des lateralen Gastrocnemiuskopfes zeigen die Tiere eine hochgradige Lahmheit mit plantigrader Fußübung bei palpatorisch und sonographisch intakter Achillessehne (4, 15, 16, 20).

Die klinische Verdachtsdiagnose kann durch die Röntgenuntersuchung erhärtet werden. Durch die wiederholten Mikrotraumata und Sehnenfaserausrisse entwickeln sich periostale Reaktionen am kaudalen Femur und den Fabellae (2, 16). Es werden glattrandige und scharf begrenzte Knochenneubildungen sichtbar, gleichzeitig können sich Mineralisationen am Sesambein und im umgebenden Gewebe bilden (18). Bei Veränderungen an den Sesambeinen muss differenziert werden zwischen gelenkseitigen Veränderungen im Sinne von Arthrosen und Veränderungen zum Muskel hin, die eine Insertionsdesmopathie darstellen (2). Außerdem können proximal und kaudal der Sesambeine im Muskel knochendichte Verschattungen im Sinne von dystrophischen Verkalkungen auftreten, da hier eine besonders hohe mechanische Belastung besteht (2, 4).

Im Fall einer vollständigen Avulsion eines Muskelbauches zeigt sich röntgenologisch eine Verlagerung der entsprechenden Fabella nach distal. Zur besseren Beurteilung können Stressaufnahmen mit gebeugtem Tarsus nötig sein (9, 12, 15, 16). Eine verlagerte Fabella oder periostale Reaktionen am Ursprung des M. gastrocnemius ohne begleitende klinische Symptome können allerdings auch Nebenbefunde ohne klinische Relevanz darstellen (2, 14).

Die MRT eignet sich sehr gut zur diagnostischen Abklärung pathologischer Veränderungen am Muskel-Sehnen-Apparat. Neben der Beurteilung von Veränderungen in Muskelgröße, -form und -symmetrie ermöglicht die Abweichung der Signalintensität in verschiedenen Sequenzen die Unterscheidung zwischen Muskelödemen, Fettinfiltrationen und Neoplasien. In Kombination mit Vorbericht und klinischen Befunden erlaubt dies häufig eine Diagnosestellung (6). In der Untersuchung von Stahl et al. (18) stellte sich in der T1-gewichteten Sequenz der betroffene Bereich um die Sesambeine nach proximal an den Muskelurprung ziehend iso- bis geringgradig hyperintens zur Umgebung dar. In dem hier beschriebenen Fall hingegen war in der genannten Sequenz ein hypointenses Areal sichtbar. Der Unterschied der Signalintensität in T1-gewichteten Sequenzen lässt sich durch das Stadium der Erkrankung erklären. T1-hypointense Areale sprechen für das Vorliegen eines Ödems und damit am wahrscheinlichsten für einen zumeist subakuten Prozess, während die Infiltration des geschädigten Gewebes mit Fettzellen zu einer T1-Hyperintensität führt und so auf einen chronischen Prozess hinweist (6). In der vorliegenden Untersuchung war in diesem Bereich eine deutliche Aufnahme von Kontrastmittel zu erkennen, was sich als Folge eines aktiven Prozesses im Sinne einer Entzündung erklären lässt (18). In einer T2-gewichteten und einer fettunterdrückten T2-Sequenz zeigen sich Signalanhebungen in Bereichen, in denen sich Muskelödeme befinden. In diesem Fall waren dies der Muskelurprung und das Sesambein (1, 6, 18). Hilfreich ist auch die fettunterdrückte Sequenz (STIR). Hier findet sich ebenfalls eine Signalanhebung in den entsprechenden Arealen (1, 18). Akute gering- bis mittelgradige Muskelverletzungen im Sinne von Kontusionen oder Muskelzerrungen stellen sich im MRT häufig als Ödem des Muskel-Sehnen-Übergangs dar. Zusätzlich können Hämatome vorhanden sein (18, 20). Bei Verdacht auf eine Blutung ist zusätzlich eine T2*-Sequenz anzuraten. Hierbei stellen sich Abbauprodukte von Blutbestandteilen als Signalauslöschung dar (13).

Bei chronischen Muskelsehnenrissen können hyperintense Fettinfiltrationen in der T1-Sequenz dargestellt werden (6). Kommt es zu wiederholten Zerrungen, entsteht weiterhin Bindegewebe und Narbengewebe (1, 20). Einen weiteren Hinweis auf einen chronischen Prozess stellen die Mineralisationen im Bereich der Sesambeine und des Muskelurprungs am Femur dar, die sowohl im Röntgenbild als auch in der MRT nachweisbar sind (18).

Bei Zerrungen und partiellen Avulsionen sollte eine konservative Therapie mittels Ruhe, Gabe von nichtsteroidalen Antiphlogistika und Physiotherapie durchgeführt werden. Unterstützend kann im chronischen Zustand das Anlegen warmer Kompressen hilfreich sein (10, 18, 20). Bei partiellen Avulsionen des

Fazit für die Praxis

Die Muskulotendinopathie des M. gastrocnemius ist eine seltene Erkrankung, die aber bei sportlich eingesetzten Hunden eine wichtige Differenzialdiagnose zum Kreuzbandriss darstellt. Klinische und radiologische Untersuchung lassen meist eine Verdachtsdiagnose zu, die durch eine Magnetresonanztomographie bestätigt werden kann. Bei konservativer Therapie über 6 Wochen mit strikter Ruhighaltung, Gabe nichtsteroidaler Antiphlogistika und begleitender Physiotherapie besteht eine sehr gute Prognose.

M. gastrocnemius wird außerdem der Einsatz von therapeutischem Ultraschall beschrieben (9).

Die Prognose für die Muskulotendinopathie des M. gastrocnemius ist bei einer Schonphase von mindestens 6 Wochen als sehr gut zu bezeichnen. Stahl et al. (18) berichteten bei acht von neun Hunden über ein exzellentes Ergebnis mit Wiederaufnahme des Trainings nach Beendigung der konservativen Therapie (18). Auch bei dem hier vorgestellten Labrador Retriever kam es zu einer vollständigen Remission der Lahmheit und einer Rückkehr zum sportlichen Einsatz. Von den drei anderen Hunden, die in der Klinik für Kleintiere der Justus-Liebig-Universität mit einer Muskulotendinopathie des M. gastrocnemius vorgestellt wurden, konnte (nach telefonischer Rücksprache mit den Besitzern) durch konservative Therapie bei zwei Hunden eine Lahmheitsfreiheit und bei einem eine deutliche Besserung der Lahmheit erzielt werden.

Die MRT-Untersuchung nach konservativer Therapie zeigte bei dem Patienten dieses Fallberichts Hinweise auf eine Fibrosierung des geschädigten Muskelareals. Nach Wissen der Autoren handelt es sich um die erste beschriebene MRT-gestützte Kontrolle der Muskulotendinopathie des M. gastrocnemius beim Hund.

Beim Menschen ist ein Rezidiv dieser Erkrankung mit nur 0,7% nach konservativer Therapie sehr selten (8). Wie hoch die Rezidivrate beim Hund liegt, müssen aufgrund des seltenen Auftretens dieser Erkrankung multizentrische Untersuchungen zeigen.

Danksagung

Unser herzlicher Dank geht an die Kleintierpraxis Lechtermannshof und an Nicole Gies für die ausgezeichnete Zusammenarbeit.

Interessenkonflikt

Die Autoren bestätigen, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

1. Bencardino JG, Rosenberg ZS, Brown RR, Hassankhani A, Lustrin ES, Beltran J. Traumatic musculotendinous injuries of the knee: diagnosis with MR Imaging. *Radiographics* 2000; 20: 103–120.
2. Dawid N, Mayerhofer E. Zur Röntgendiagnostik von Insertionstendopathien im Kniegelenksbereich des Hundes. *Wien Tierärztl Mschr* 1992; 79: 171–177.
3. Jacobson JA, Miller BS, Morag Y. Golf and recquet sports injuries. *Semin Musculoskelet Radiol* 2005; 9: 346–359.
4. Kramer M, Schimke E, Gerwing M, Schleich S, Michele U. Achillessehnen-erkrankungen bei Hund und Katze. *Tierärztl Prax* 1998; 26 (K): 238–246.
5. Liebich H-G, König HE. Hinter- oder Beckengliedmaßen (Membra pelvina). In: *Anatomie der Haussäugetiere*. König HE, Liebich H-G, Hrsg. Stuttgart: Schattauer 2001; 203–264.
6. May DA, Disler DG, Jones EA, Balkissoon AA, Manaster BJ. Abnormal signal intensity in skeletal muscle at MR imaging: patterns, pearls and pitfalls. *Radiographics* 2000; 20: 295–315.
7. Menz MJ, Lucas GL. Magnetic resonance imaging of a rupture of the medial head of the gastrocnemius muscle. *J Bone Joint Surg* 1991; 73 A (8): 1260–1262.
8. Millar AP. Strains of the posterior calf musculature (“tennis leg”). *Am J Sports Med* 1979; 7 (3): 172–174.
9. Mueller MC, Gradner G, Hittmair KM, Dupré G, Bockstahler BA. Conservative treatment of partial gastrocnemius muscle avulsions in dogs using therapeutic ultrasound – A force plate study. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2009; 22: 243–248.
10. Muir P, Dueland RT. Avulsion of the origin of the medial head of the gastrocnemius muscle in a dog. *Vet Rec* 1994; 135: 259–260.
11. Piermattei DL. Avulsion of the distal tendon of the gastrocnemius muscle. *Proceedings 1st Annual Veterinary Surgical Forum – Europe* 1986; 27–29.
12. Reinke JD, Kus SP, Owens JM. Traumatic avulsion of the lateral head of the gastrocnemius and superficial digital flexor muscles in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 1982; 18: 252–256.
13. Von Kummer R, Müller A, Staudt M, Grodd W, Mader I, Brückmann H, Reith W, Rodiek SO, Yousry TA, Seelos KC, Steinborn M, Schubiger O, Hosten N, Zwicker C, Langer M, Fürst G, Berg J, Vogel TJ, Gademann G. *Gehirn, Gesichtsschädel und Hals*. In: *Magnetresonanztomographie*. Reiser M, Semmler W, Hrsg. Berlin: Springer 2002; 133–451.
14. Rendano VT. Variation in location of gastrocnemius sesamoid bones (Fabellae) in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 1978; 173: 200–202.
15. Ridge PA, Owen MR. Unusual presentation of avulsion of the lateral head of the gastrocnemius muscle in a dog. *J Small Anim Pract* 2005; 46: 196–198.
16. Robinson A. Atraumatic bilateral avulsion of the origins of the gastrocnemius muscle. *J Small Anim Pract* 1999; 40: 498–500.
17. Seiferle E, Frewein J. Aktiver Bewegungsapparat, Muskelsystem, Myologia. In: *Lehrbuch der Anatomie der Haussäugetiere*. Frewein J, Wille K-H, Wilkens H, Hrsg. Stuttgart: Parey 2004; 273–585.
18. Stahl C, Wacker C, Weber U, Forterre F, Hecht P, Lang J, Gorgas D. MRI features of gastrocnemius musculotendinopathy in herding dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 2010; 51 (4): 380–385.
19. Stevens MA, El-Khoury GY, Kathol MH, Brandser EA, Chow S. Imaging features of avulsion injuries. *Radiographics* 1999; 19: 655–672.
20. Schulz K. Management of muscle and tendon injury or disease. In: *Small Animal Surgery*. Fossum TW, ed. St. Louis: Mosby, Elsevier 2007; 1316–1332.

Article

The Role of Femoral Head Size and Femoral Head Coverage in Dogs with and without Hip Dysplasia

Mehmet Pilli ¹, Deniz Seyrek Intas ^{1,*}, Ilker Etikan ², Pelin Yigitgor ³, Martin Kramer ⁴, Bernd Tellhelm ⁴ and Kerstin von Puckler ⁴

¹ Department of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Near East University, Near East Avenue, Nicosia 99010, Turkey

² Department of Biostatistics, Faculty of Medicine, Near East University, Near East Avenue, Nicosia 99010, Turkey

³ Department of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Bursa Uludag University, Gorukle Campus, Nilufer, Bursa 16059, Turkey

⁴ Small Animal Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Justus-Liebig University, 35392 Giessen, Germany

* Correspondence: deniz.seyrekintas@neu.edu.tr or deniz.seyrek.intas@gmail.com; Tel.: +90-392-6751000 (ext. 3155) or +90-533-8564912

Simple Summary: Canine hip dysplasia is a nonhealing developmental orthopedic disorder resulting in osteoarthritis of the hip joints and lameness. Radiography is an important tool to diagnose, grade and assess prognosis in hip dysplasia. The purpose of this study was to investigate radiographically detectable and measurable parameters that could indicate a predisposition to hip dysplasia. Radiographs of 264 dogs presented for canine hip dysplasia screening were evaluated for femoral head size, coverage of the femoral head by the acetabulum and acetabular length in relation to dysplasia status according to the Fédération Cynologique Internationale. No significant relationship between femoral head area and Fédération Cynologique Internationale assessment was detected. Femoral head area was breed-specific and larger in non-dysplastic dogs, males and German wirehaired pointers. Coverage of the femoral head by the acetabulum was significantly affected by presence of dysplasia and breed. All breeds and both sexes showed strong positive correlations between femoral head area and acetabular length.



Citation: Pilli, M.; Seyrek Intas, D.; Etikan, I.; Yigitgor, P.; Kramer, M.; Tellhelm, B.; von Puckler, K. The Role of Femoral Head Size and Femoral Head Coverage in Dogs with and without Hip Dysplasia. *Vet. Sci.* **2023**, *10*, 120. <https://doi.org/10.3390/vetsci10020120>

Received: 26 December 2022

Revised: 25 January 2023

Accepted: 2 February 2023

Published: 4 February 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The subject of hip dysplasia in dogs is still current and preoccupies both animal owners and veterinarians. Major factors affecting the development of the disorder are hip laxity and incongruent joints. Many studies on etiology, pathogenesis, and early diagnosis have been performed to reduce prevalence and select healthy dogs for breeding. The purpose of the present study was to investigate a possible relationship between dysplasia and femoral head area (FHA), femoral coverage by the acetabulum (CFH) and cranio-caudal distance of the dorsal acetabular rim (CrCdAR). Radiographs of a total of 264 skeletally mature dogs with similar physical characteristics (German wirehaired pointers (GWP), German shepherd dogs (GSD) and Labrador retrievers (LAB)) presented for routine hip dysplasia screening were recruited for the study. FHA, CFH and CrCdAR were measured and related to dysplasia status. Evaluations of FHA ($p = 0.011$), CFH ($p < 0.001$) and CrCdAR length ($p = 0.003$) measurements revealed significant interactions between breed, sex and FCI scores, so they had to be assessed separately. The results revealed that FHA tends to decrease as the hip dysplasia score worsens. There was no significant relationship between FHA and dysplasia assessment. FHA is breed-specific and is larger in normal and near-normal male ($p = 0.001$, $p = 0.020$) and female ($p = 0.001$, $p = 0.013$) GWP compared to GSD, respectively. FHA is greater in normal male GWP ($p = 0.011$) and GSD ($p = 0.040$) compared to females. There was a significant and strong positive correlation between FHA and CrCdAR in all breeds and sexes. Additionally, FCI scoring had a medium (GWP, GSD) to strong (LAB) negative correlation with CFH.

Keywords: coverage; dog; femoral head area

1. Introduction

Canine hip dysplasia (CHD) is a multifactorial developmental disease with strong genetic background encountered in many large dog breeds leading to lameness and degenerative joint disease caused by joint instability and incongruent joint conformation. Early detection of the condition is unreliable [1,2] and causes economic losses especially in competing dogs. Investigation for CHD in skeletally mature dogs is performed by taking radiographs of the hips with extended femora. Screening associations such as the Fédération Cynologique Internationale (FCI) evaluate hip joint morphology, presence or absence of signs of osteoarthritis, joint laxity, and Norberg angle (NA) [3–5]. Femoral head coverage, defined as the overlap of the femoral head by the dorsal acetabular roof, has also been evaluated as a parameter to evaluate CHD status [6–8] and helps in assessing success rates after pelvic surgeries [9,10]. Coxo-femoral joint incongruence is an important radiographic finding and criterion for the scoring and assignment to FCI dysplasia categories. Joint incongruence may be a consequence of both joint laxity resulting from increased elasticity of the soft tissues of the joint and/or size/shape incompatibility of the femoral head and acetabulum. Femoral head shape has been related to CHD [11] with poor correlation; however, to the best of our knowledge, femoral head size has not been measured and associated with CHD, although this is also expected to affect the NA. Studies on artificial intelligence and machine learning are emerging in the field of medical imaging to aid in hip screening applications [12]. Morphological studies are needed to validate certain programs, define certain patterns and select appropriate candidates (breeds) for training.

The purpose of this study was to find out whether femoral head area (FHA), percentage coverage of the femoral head (CFH), and length of the cranio-caudal dorsal acetabular rim (CrCdAR) were related to CHD investigated in three dog breeds with relatively high prevalence and risk for CHD [13]. The effect of breed and sex on these parameters was also of interest. Further, it needed to be determined whether it made a difference to compare dysplastic dogs (FCI-C/D/E) with non-dysplastic dogs comprising only FCI-A scores or also include those with FCI-B scores assigning them as “non-dysplastic” [2].

2. Materials and Methods

Client-owned German wirehaired pointers (GWP), German shepherd dogs (GSD) and Labrador retrievers (LAB) of both sexes presented for routine CHD screening were included in the study. The animals recruited for the study were skeletally mature, ranging in age between 1–4 years, and the mean age was 1.9 years (median 2), 1.8 (median 1) and 1.2 years (median 1) in the GWP, GSD and LAB, respectively. Mean bodyweight was 28.7 ± 2.9 kg in GWP, 29.4 ± 4.3 kg in GSD and 31.8 ± 4.1 kg in LAB.

Radiographs were taken with digital radiography in symmetrical ventrodorsal projection with extended, parallel femora and patellae in the middle of the femoral condyles while dogs were under general anesthesia with muscle relaxation achieved by a routine injectable anesthetic protocol. Hip joints were evaluated for dysplasia based on FCI criteria from A to E [3–5] for every hip joint separately by blinded authorized investigators (DSI, BT). DICOM reader software (Version V3.3.6, Horos, for Apple Macintosh) was utilized to determine femoral head area (FHA) and percentage femoral coverage by the acetabulum (CFH). For this purpose, measurements were performed by a trained postgraduate student (MP) blinded to dysplasia scores. The diameter, circumference and FHA were determined by drawing the best fitting circle around the femoral head using a circle template with a line of least thickness. The overlap of FHA and dorsal acetabular roof (surface femoral coverage) was determined by drawing a line along the dorsal acetabular rim connecting to the circle of the femoral head cranially and caudally. Area calculations were performed by the software and recorded in square centimeters. Percentage CFH was calculated manually by dividing FHA superimposed by the acetabulum by the total FHA and multiplied by 100 [6,8,9]. Each individual hip score was related to FHA and CFH. Comparisons were made between dysplasia-free and dysplastic hips. Dysplasia-free was defined as hips having a score A, while dysplastic was defined as having mild, moderate or severe CHD

(score C–E). Additionally, the shortest distance between the cranio-lateral edge and the caudo-lateral edge of the acetabulum was measured with the distance tool of the DICOM reader software and related to the corresponding FHA (Figure 1).

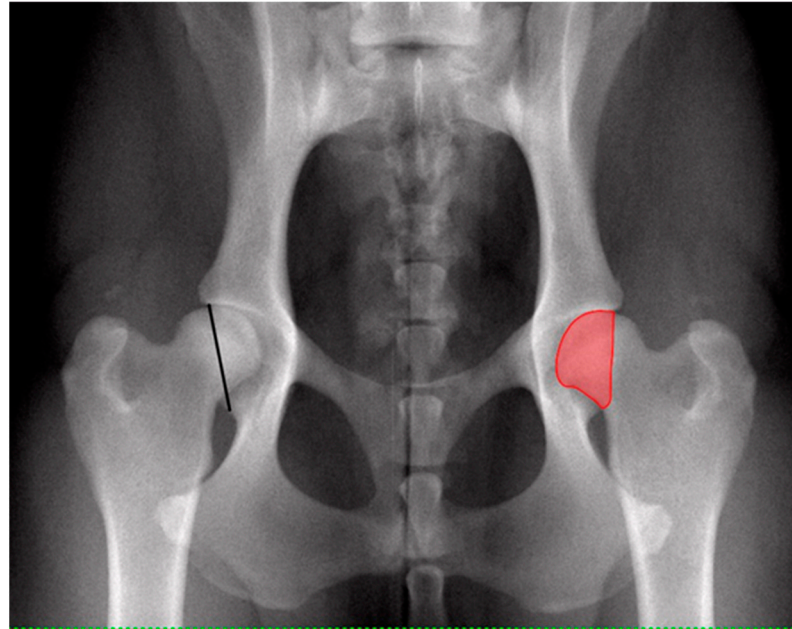


Figure 1. Ventrrodorsal pelvic radiograph of normal coxofemoral joints (left) indicating the cranio-caudal distance of the dorsal acetabular rim (CrCdAR), the shortest distance (black line) between the cranio-lateral edge and the caudo-lateral edge of the acetabulum and (right) surface coverage of femoral head (CFH, red area).

The data of the present study were analyzed using the IBM SPSS Statistics 23.0 program. Mean and standard deviation values were given for the quantitative (continuous) variables used in the research. The normality of variables was evaluated using the Komogorov–Smirnov test. A linear mixed model was used to evaluate the relationship between femoral head area (FHA), coverage of the femoral head (CFH) and cranio-caudal acetabular rim (CrCdAR) length with dysplasia status (FCI). For this purpose, the right and left measurements of the assessed bones were included in the model as a random effect subject. The model also included the influence of three different breeds and two sexes. FCI score was modeled as A, B, C, D and E levels. Breed, sex and FCI score were considered as fixed factors, and specific relationship effects were included in the model as well as main effects of the factors. In the first stage, the specific relationship effects were evaluated, and if this effect was found to be significant, the main effects were not evaluated. Significant differences were determined by the Sidak post hoc test with Bonferroni correction. In addition, the relationship of FHA, CFH, and CrCdAR length with FCI score was evaluated separately for each breed and sex with Spearman’s rank correlation analysis. The statistical significance level was determined as $\alpha = 0.05$. p -values below this value were considered statistically significant ($p < 0.05$), and p values above this value were considered statistically insignificant ($p > 0.05$).

3. Results

A cohort of 264 dogs including GWP, GSD and LAB of both sexes were evaluated. Breed and sex distribution of the dogs are shown in Table 1.

Table 1. Breed and sex distribution of dogs.

	GWP (n)	GSD (n)	LAB (n)	Total
Male	43	34	51	128
Female	43	47	46	136
Total	86	81	97	264

GWP, German wirehaired pointers; GSD, German shepherd dogs; LAB, Labrador retrievers.

Hip scores with breed and sex distribution are shown in Table 2. The cohort revealed a prevalence of CHD in GWP, GSD and LAB of 11.6%, 35.8% and 44.3%, respectively.

Table 2. Distribution of Fédération Cynologique Internationale (FCI) dysplasia status of hip joints with respect to breed and sex in German wirehaired pointers (GWP), German shepherd dogs (GSD) and Labrador retrievers (LAB).

FCI Score	Male				Female			
	GWP	GSD	LAB	Total	GWP	GSD	LAB	Total
A	39	21	24	84	51	18	27	96
B	37	32	32	101	25	33	25	83
C	5	5	24	34	10	20	27	57
D	5	6	16	27	0	12	9	21
E	0	4	6	10	0	11	4	15
Total	86	68	102	256	86	94	92	272

FCI, Fédération Cynologique Internationale; GWP, German wirehaired pointers; GSD, German shepherd dogs; LAB, Labrador retrievers.

3.1. Femoral Head Area (FHA)

As a result of the evaluations for FHA measurements, it was observed that there was a specific relationship between breed, sex and FCI score ($p = 0.011$). As the relationship was significant, comparisons for each breed and sex with FCI levels in terms of FHA had to be evaluated separately. Therefore, in Table 3, FHA averages are given separately for each breed, sex and FCI level. As can be seen from the numbers listed in Table 2, there were no GWP breed males with FCI level E and no GWP females with FCI level D or E. Male and female GSD and LAB had all levels of FCI scoring. There were no dogs for the rows indicated with (–) in Table 3.

In Table 4, FCI levels (A to E) are compared in terms of FHA measurements, separately for each breed and sex, and the p -values for the differences between the levels are included. As a result of the evaluations, there was no significant difference between FCI levels among male and female dogs. In male GSD, the mean FHA in those with FCI levels A, B, C and D was found to be significantly smaller than in those with E level. No other significant difference was found. No significant difference was found between FCI levels in female GSD. There was no significant difference between FCI levels in both male and female LAB.

According to the results obtained, while the mean FHA in those with FCI level E was found to be significantly larger than in those with other FCI levels only in GSD and male sex, the results of FCI comparisons in all other breeds and sexes were not significant. In this case, it was decided that FCI level E could be differentiated from other levels by looking at FHA measurements in male dogs of the GSD breed. However, in other conditions, the FHA level did not have a distinctive role in terms of disease severity.

Table 5 shows the significance of the interracial differences for each sex and FCI level.

Table 3. Mean values (cm²) of femoral head area (FHA) sorted by breed, sex and Fédération Cynologique Internationale (FCI) results.

Breed	FCI	Male			Female		
		n	Mean	SD	n	Mean	SD
GWP	A	39	4.416	0.749	51	4.015	0.697
	B	37	4.034	0.914	25	3.877	0.693
	C	5	3.735	0.645	10	3.662	0.836
	D	5	4.292	0.700	0	–	–
	E	0	–	–	0	–	–
GSD	A	21	3.701	0.676	18	3.208	0.429
	B	32	3.544	0.793	33	3.313	0.722
	C	5	3.547	0.672	20	3.235	0.569
	D	6	3.116	0.737	12	3.099	0.469
	E	4	5.295	1.841	11	3.773	1.027
LAB	A	24	3.397	0.388	27	3.098	0.526
	B	32	3.046	0.641	25	3.341	1.033
	C	24	3.055	0.505	27	2.965	0.674
	D	16	2.886	0.488	9	3.002	0.870
	E	6	2.913	0.287	4	3.647	1.374

FCI, Fédération Cynologique Internationale; GWP, German wirehaired pointers; GSD, German shepherd dogs; LAB, Labrador retrievers; SD, standard deviation.

Table 4. Comparison of Fédération Cynologique Internationale (FCI) levels in terms of mean femoral head area (FHA) for each breed and sex.

Breed	Sex	FCI	FCI			
			B	C	D	E
			<i>p</i> -Values			
GWP	Male	A	0.122	0.254	0.999	0.973
		B				
		C				
		D				
	Female	A	0.820	0.405	0.813	0.999
		B				
		C				
		D				
GSD	Male	A	0.997	1.000	0.570	0.001
		B				
		C				
		D				
	Female	A	1.000	1.000	1.000	0.346
		B				
		C				
		D				
LAB	Male	A	0.529	0.657	0.261	0.785
		B				
		C				
		D				
	Female	A	0.924	0.999	1.000	0.820
		B				
		C				
		D				

FCI, Fédération Cynologique Internationale; GWP, German wirehaired pointers; GSD, German shepherd dogs; LAB, Labrador retrievers.

Table 5. Comparison of breeds in terms of mean femoral head area (FHA) for each sex and Fédération Cynologique Internationale (FCI) level.

Sex	FCI	Breed	Breed	
			GSD	LAB
			<i>p</i>	<i>p</i>
Male	A	GWP	0.001	0.000
		GSD		0.409
	B	GWP	0.016	0.000
		GSD		0.018
	C	GWP	0.968	0.159
GSD		0.422		
Female	D	GWP	0.022	0.001
		GSD		0.885
	E	GWP		0.000
		GSD		
	Female	A	GWP	0.000
GSD				0.944
B		GWP	0.010	0.027
		GSD		0.999
C		GWP	0.335	0.028
GSD		0.500		
E	GWP		0.761	
	GSD		0.764	

FCI, Fédération Cynologique Internationale; GWP, German wirehaired pointers; GSD, German shepherd dogs; LAB, Labrador retrievers.

As a result of the evaluations, it could be said that there was a significant difference between GWP and GSD and between GWP and LAB in males with an FCI result of A, and the mean FHA was significantly larger in the GWP breed. There was a significant difference between all three breeds in males with FCI level B, and the highest mean was found in GWP, followed by GSD and the lowest in LAB. No interbreed differences were found in male dogs with FCI level C. There was a significant difference between GWP and GSD and between GWP and LAB in male dogs with FCI level D, but there was no significant difference between GSD and LAB. FHA values for male GSD were significantly larger in FCI-E dogs compared to related LAB. There was only a significant difference between GWP and GSD and between GWP and LAB in female dogs with FCI level A and FCI level B. In females with FCI level C, there was a significant difference only between GWP and LAB, and the mean FHA was significantly larger in the GWP breed.

Table 6 shows significant differences between the sexes separately for each breed and FCI level. As a result of the evaluations, the mean FHA of males was significantly larger in GWP and those with FCI level A, but there was no significant difference between sexes in this breed among those with FCI levels B and C. The mean FHA of males was significantly larger in GSD and those with FCI levels A and E, but there was no significant difference between sexes in those with FCI levels B, C and D in this breed. There was no significant difference between the sexes in the LAB breed with FCI levels A–E.

Table 6. Comparison of sexes in terms of mean femoral head area (FHA) for each breed and Fédération Cynologique Internationale (FCI) level.

Breed	FCI	Sex	Sex
			Female
			<i>p</i>
GWP	A	Male	0.009
	B	Male	0.403
	C	Male	0.854
	D	Male	
	E	Male	
GSD	A	Male	0.034
	B	Male	0.199
	C	Male	0.388
	D	Male	0.963
	E	Male	0.000
LAB	A	Male	0.141
	B	Male	0.127
	C	Male	0.657
	D	Male	0.709
	E	Male	0.116

FCI, Fédération Cynologique Internationale; GWP, German wirehaired pointers; GSD, German shepherd dogs; LAB, Labrador retrievers.

The findings in Tables 4–6 were the results obtained for five different FCI levels (A to E). In particular, Table 4 lists the results of the comparison of FCI levels in each breed and sex in terms of mean FHA and shows the role of FHA in the diagnosis of the disease. Tables 5 and 6 explain breed and sex differences in terms of FHA.

3.2. Coverage of Femoral Head Area (CFH)

As a result of the evaluations for CFH measurements, it was observed that there was a specific relationship between breed, sex and FCI score ($p < 0.001$). As the relationship was significant, comparisons for each breed and sex with FCI levels in terms of CFH had to be evaluated separately. Therefore, in Table 7, CFH averages are given separately for each breed, sex and FCI level. As can be seen from the numbers in Table 2, there were no GWP breed males with FCI level E and no GWP females with FCI level D or E. Male and female GSD and LAB had all levels of FCI scoring. There were no dogs for the rows indicated with (–) in Table 7. When a cut-off value of 50% was selected to distinguish dysplastic from non-dysplastic dogs, among the FCI-A scored dogs, 3% of GWP, 5% of GSD and none of LAB were misclassified.

In Table 8, FCI levels (A to E) are compared in terms of CFH measurements, separately for each breed and sex, and the p -values for the differences between the levels are included. As a result of the evaluations, a significant difference was found between FCI levels A and C and between A and B in males and females of GWP race, and there were significant differences between A and D and B and D in males. It was seen that the mean was higher in A, followed by B, C and D, respectively. In male GSD, the mean CFH of those with FCI levels A, B, C and D was found to be significantly higher than the mean CFH of those with E level. There was also a significant difference between A and D. Apart from this, no significant difference was found. In female GSD, the mean CFH of those with FCI levels A, B, C and D was found to be significantly lower than the mean CFH of those with E level. There was a significant difference between A and C, A and D, and B and D. No other significant difference was found. All FCI levels were found to be significantly different from each other in male LAB; in females, only the difference between B and C was not significant, whereas the other differences were found to be significant.

Table 7. Mean values (%) for coverage of femoral head (CFH) sorted by breed, sex and Fédération Cynologique Internationale (FCI) results.

Breed	FCI	Male			Female		
		n	Mean	SD	n	Mean	SD
GWP	A	39	60.675	5.686	51	60.074	5.509
	B	37	57.117	6.133	25	56.811	4.775
	C	5	47.521	7.085	10	48.702	6.309
	D	5	40.117	8.805	0		
	E	0	–		0		
GSD	A	21	61.046	5.377	18	59.875	5.442
	B	32	57.945	6.459	33	54.906	5.992
	C	5	54.656	8.309	20	52.693	8.777
	D	6	52.102	8.877	12	47.019	10.381
	E	4	37.445	6.059	11	28.515	16.268
LAB	A	24	67.325	5.826	27	67.632	8.311
	B	32	56.080	6.791	25	55.587	4.153
	C	24	50.413	6.360	27	51.920	5.671
	D	16	39.162	7.376	9	43.248	8.660
	E	6	22.419	8.468	4	22.520	7.019

FCI, Fédération Cynologique Internationale; GWP, German wirehaired pointers; GSD, German shepherd dogs; LAB, Labrador retrievers; SD, standard deviation.

Table 8. Comparison of Fédération Cynologique Internationale (FCI) levels in terms of mean coverage of femoral head (CFH) for each breed and sex.

Breed	Sex	FCI	FCI			
			B	C	D	E
GWP	Male	A	0.132	0.000	0.000	
		B		0.019	0.000	
		C			0.427	
		D				
	Female	A	0.143	0.000		
		B		0.005		
		C				
		D				
GSD	Male	A	0.672	0.461	0.046	0.000
		B		0.977	0.428	0.000
		C			1.000	0.002
		D				0.009
	Female	A	0.123	0.012	0.000	0.000
		B		0.945	0.006	0.000
		C			0.207	0.000
		D				0.000
LAB	Male	A	0.000	0.000	0.000	0.000
		B		0.021	0.000	0.000
		C			0.000	0.000
		D				0.000
	Female	A	0.000	0.000	0.000	0.000
		B		0.419	0.000	0.000
		C			0.010	0.000
		D				0.000

FCI, Fédération Cynologique Internationale; GWP, German wirehaired pointers; GSD, German shepherd dogs; LAB, Labrador retrievers.

Comparisons of sex in terms of mean coverage of femoral head (CFH) were made for each breed and Fédération Cynologique Internationale (FCI) level. There was a significant difference between GWP and LAB ($p = 0.001$) and between GSD and LAB ($p = 0.006$) in males with an FCI score of A. There was a significant difference between GWP and LAB ($p < 0.001$) and between GSD and LAB ($p = 0.001$) in females with an FCI score of A. The differences between GWP and GSD ($p = 0.012$) and GSD and LAB ($p < 0.001$) were significant in males with an FCI score of D. It can be said that there was a significant difference between GSD and LAB ($p = 0.001$) in male dogs with FCI level E, and the mean CFH was significantly higher in the GSD breed. Remaining differences were statistically insignificant. The mean CFH of males was significantly higher in only GSD with FCI score of E compared to females.

3.3. Cranio-Caudal Acetabular Rim (CrCdAR) Length

As a result of the evaluations for CrCdAR measurements, it was observed that there was a specific relationship between breed, sex and FCI score ($p = 0.003$). As the relationship was significant, comparisons for each breed and sex with FCI levels in terms of CrCdAR length needed to be evaluated separately. Therefore, in Table 9, CrCdAR length averages are given for each breed, sex and FCI score. As can be seen from the numbers shown in Table 2, there were no GWP breed males with an FCI score of E, and no GWP females with an FCI score of D or E. Male and female GSD and LAB had all levels of FCI scoring. There were no dogs for the rows indicated with (–) in Table 9.

Table 9. Mean values (cm) of cranio-caudal acetabular rim (CrCdAR) lengths sorted by breed, sex and Fédération Cynologique Internationale (FCI) results.

Breed	FCI	n	Male Mean	SD	n	Female Mean	SD
GWP	A	39	3.023	0.285	51	2.842	0.252
	B	37	2.859	0.309	25	2.688	0.186
	C	5	2.772	0.106	10	2.681	0.265
	D	5	3.063	0.159	0	–	–
	E	0	–	–	0	–	–
GSD	A	21	2.917	0.313	18	2.671	0.165
	B	32	2.832	0.316	33	2.716	0.237
	C	5	2.757	0.167	20	2.696	0.190
	D	6	2.765	0.329	12	2.735	0.203
	E	4	3.183	0.549	11	3.085	0.322
LAB	A	24	2.805	0.137	27	2.527	0.250
	B	32	2.609	0.335	25	2.675	0.366
	C	24	2.700	0.226	27	2.673	0.198
	D	16	2.615	0.292	9	2.753	0.321
	E	6	2.699	0.250	4	2.935	0.473
Total	A	84	2.934	0.273	96	2.721	0.273
	B	101	2.771	0.335	83	2.695	0.268
	C	34	2.719	0.203	57	2.683	0.204
	D	27	2.731	0.322	21	2.743	0.253
	E	10	2.892	0.445	15	3.045	0.356

FCI. Fédération Cynologique Internationale; GWP. German wirehaired pointers; GSD. German shepherd dogs; LAB. Labrador retrievers; SD. standard deviation.

In terms of CrCdAR measurements, FCI levels (A to E) were compared for each breed and sex separately. As a result of the evaluations, in males ($p = 0.049$) and females ($p = 0.050$) of GWP, CrCdAR length only in those with FCI level A was found to be significantly larger than in those with FCI-B. The mean CrCdAR length in GSD females with FCI levels A, B, C ($p = 0.001$ for each) and D ($p = 0.020$) was significantly larger than in those with FCI level E. In females of the LAB breed, the mean CrCdAR length only in those with FCI level E was

found to be significantly larger than in those with FCI-A ($p = 0.048$). Apart from these, no significant difference was found between FCI levels.

CrCdAR measurements of FCI-A GWP were found to be significantly larger than those of LAB in males ($p = 0.006$) and females ($p < 0.001$). In FCI-B dogs, values of GWP ($p < 0.001$) and GSD ($p = 0.003$) were significantly larger than those of LAB. In FCI-D dogs, CrCdAR lengths in male GWP were significantly larger compared to those of LAB ($p = 0.004$). CrCdAR lengths in FCI-E scored male GSD were significantly larger compared to those of LAB ($p = 0.006$).

Comparison of mean CrCdAR values in male and female dogs revealed that values of FCI-A males in all three breeds (GWP: $p = 0.002$; GSD: $p = 0.005$; LAB: $p < 0.001$) were significantly greater than those of females. Additionally, FCI-B male GWP values were significantly greater than those of females.

Table 10 shows the correlations between FHA, CFH and CrCdAR measurements and FCI evaluations by breed and sex. Accordingly, except for GWP and LAB males that showed a weak negative correlation (the smaller FHA, the worse the FCI score), there was no significant correlation between FCI scores and FHA. The negative correlation (the smaller CFH, the worse the FCI score) between FCI scoring and CFH was moderate in GWP and GSD and high in LAB in both sexes. Correlations between FCI scoring and CrCdAR lengths were inconsistent in males and females of all breeds. Similarly, there was no correlation between FHA and CFH. However, the FHA and CrCdAR length showed a high positive correlation in all breeds and sexes, apart from female LAB, who showed a moderate correlation.

Table 10. Correlations between measurements made separately for each breed and sex and the Fédération Cynologique Internationale (FCI) dysplasia status.

Breed	Sex		FHA			CFH			CrCdAR		
			N	r	P	N	r	P	N	r	P
GWP	Male	FCI	-0.271	0.012	86	-0.512	0.000	86	-0.263	0.014	86
		FHA				0.113	0.301	86	0.840	0.000	86
		CFH						86	0.122	0.263	86
	Female	FCI	-0.177	0.104	86	-0.468	0.000	86	-0.320	0.003	86
		FHA				0.010	0.928	86	0.740	0.000	86
		CFH						86	-0.029	0.792	86
GSD	Male	FCI	-0.034	0.782	68	-0.473	0.000	68	-0.080	0.518	68
		FHA				-0.134	0.276	68	0.828	0.000	68
		CFH						68	-0.039	0.752	68
	Female	FCI	0.037	0.721	94	-0.560	0.000	94	0.250	0.015	94
		FHA				-0.110	0.293	94	0.748	0.000	94
		CFH						94	-0.236	0.022	94
LAB	Male	FCI	-0.388	0.000	102	-0.843	0.000	102	-0.137	0.170	102
		FHA				0.277	0.005	102	0.725	0.000	102
		CFH						102	0.144	0.148	102
	Female	FCI	-0.184	0.079	92	-0.784	0.000	92	0.334	0.001	92
		FHA				0.001	0.990	92	0.555	0.000	92
		CFH						92	-0.185	0.077	92

FCI, Fédération Cynologique Internationale; GWP, German wirehaired pointers; GSD, German shepherd dogs; LAB, Labrador retrievers; FHA, Femoral head area; CFH, Femoral coverage by the acetabulum; CrCdAR, cranio-caudal acetabular rim length.

One of our objectives was to investigate if it made a difference to compare dysplastic dogs (FCI-C/D/E) with non-dysplastic dogs comprising only FCI-A scores or to also include dogs with FCI-B scores by assigning them as “non-dysplastic”. However, in all parameters, statistical tests revealed an interaction between breed, sex and FCI scores that rendered merging FCI-A dogs and FCI-B dogs into one healthy group impossible.

4. Discussion

CHD is defined as an inherited incongruity of the coxofemoral joint caused by excessive laxity of joint stabilizing soft tissues ending in osteoarthritis and pain due to abnormal pressure and wear with subsequent new bone formation in certain regions of the joint. In addition to joint laxity, another reason for joint incongruity could also be a disproportion of the bony components relative to each other [3,4,14,15]. Thus, one of the objectives of the present study was to find out if the femoral head size showed any differences among FCI dysplasia status groups and to see if there was any relation of FHA to the CrCdAR length as a morphometric parameter of the acetabular size. Further, the influence of breed and sex on FHA, CFH and CrCdAR was investigated.

The prevalence of CHD in our dog population was closer to the upper limit compared to that of other studies [16,17], although studies showed that some improvement has been achieved over the years [18]. The discrepancy can be attributed to the difficulty in recruiting a typical sample of the total population and may also be due to differences in the prevalence of CHD in local dog populations. GWP dogs that had generally lower dysplasia prevalence and better FCI scores than GSD and LAB [13] showed a significantly larger FHA compared to t FCI-A and FCI-B scored dogs in the other breeds. Generally, there was a tendency of decreasing FHA values towards worse FCI scoring in both sexes. Exceptions were male FCI-D GWP dogs and FCI-E GSD dogs of both sexes and female LAB. This could be explained by the low case number and a high standard deviation rate. FHA was not found useful in distinguishing FCI levels, as only male GSD with FCI-E hips were significantly different from all the others. So, the FHA level did not have a distinctive role in terms of disease severity. Wigger et al. [11] investigated broomstick-shaped femoral heads, which were poorly or even not demarcated from the femoral neck and appeared relatively smaller than in other hips. However, no measurements were made to prove this in that study, and broomstick-shaped femoral heads did not appear to be associated with the occurrence of CHD.

Nevertheless, in our study there were some significant breed differences that were observed between GWP, GSD and LAB, although these breeds are similar in bodyweight and size. The FHA of male and female GWP in the normal and near-normal (FCI-A and B) categories were significantly larger than those of GSD and LAB. Differences between GSD and LAB were less significant.

Sex differences were only obvious in FCI-A dogs of GWP and GSD. While some studies observed no sex differences, others detected a higher prevalence of CHD in females with a variability by breed [19]. In the present study, male and female GWP and LAB had nearly the same CHD prevalence, but female GSD were twice as often affected by CHD compared to male GSD. This may suggest that females with a smaller FHA may be more prone to CHD compared to males. Studies comparing human and canine patients found that affected individuals were 80% female in humans, while in dogs, no sex predilection was proven [20,21]. Sex was also not a significant risk factor for DJD associated with CHD [22].

Investigations of CFH measurements revealed significant specific relationships in terms of breed and FCI evaluations. Several screening systems [3] and evaluation criteria [6–8,23] have been developed and employed for the selection of dogs for breeding, mainly taking signs of osteoarthritis into account. The coverage area of the femoral head by the dorsal aspect of the acetabulum is another parameter to assess hip joints for CHD. Besides the NA, percentage CFH is a measurable parameter with a suggested cutoff value of approximately $\geq 50\%$ considered to be normal, while less is considered to indicate joint incongruity and dysplasia [7,24]. However, some studies found that there are breed specific differences [7,8] that could lead to a too strict evaluation, eliminating dogs from the breeding pool. They recommend judging dogs individually as a breed instead of using universal criteria [8,25,26]. Tomlinson and Johnson [8] suggested a more accurate value of 42.2% for LAB and 44.8% for GSD, while Mostafa et al. [27] suggested a cut-off value of $< 53\%$ for the dorsal acetabular femoral head coverage area index for LAB. In our study, a limit of 45% revealed an improved evaluation of two GSD dogs classified as FCI-A (results not shown

here). This could be due to a retracted concave dorsal acetabular rim, which is sometimes observed. This might cause a smaller coverage area while other features of the joint are within normal limits. To our knowledge there are no published breed-specific data on CFH in GWP. So, in the present study, we preferred to stay with 50% as a cut-off value, a middle ground. Herewith, the FCI-A group showed 3% false positive cases in GWP, 5% in GSD, and none in LAB. CFH measurements revealed a significant relationship between breed, sex and FCI score. In male and female GWP, the CFH values of FCI-A and B were not significantly different, indicating that radiographic features were similar. However, FCI-A and B were significantly different from those of FCI-C and D in both sexes (there were no FCI-E GWP). This would mean that at least a distinction between dysplastic and non-dysplastic is reliable for GWP. In GSD, the gray-zone between dysplastic and non-dysplastic seems to be less clear, because only FCI-E hips are significantly different from those with other scores, and the remaining grades were inconsistent, with a slightly better result in females. In LAB, however, there was a clear and highly significant distinction between all FCI scores in both sexes, which makes this parameter quite valuable in terms of CHD assessment. Thus, with this feature, the LAB breed may also be considered suitable for training with machine learning.

The CrCdAR was meant to be a parameter of the acetabular size, the counterpart of the femoral head. The study needed to determine if there was a relationship between the CrCdAR length and FHA and/or CFH. It was observed that there was a specific relationship between breed, sex and FCI score. However, CrCdAR length could not be validated as a distinctive variable for CHD in terms of FCI grading, and significance levels according to breed and sex were inconsistent. FCI-A dogs had significantly greater CrCdAR lengths compared to FCI-B, C and D dogs, while differences between these FCI groups were insignificant. FCI-E dogs, however, also showed significantly greater CrCdAR lengths. Breed differences were only significant between LAB and GWP or GSD, while values for males were larger than those in females. Fealey et al. [28] investigated canine pelvic morphology and found significant differences between principal components in males and females, validating sexual dimorphism of the pelvis. Male dogs had significantly larger pelvises than bitches. They observed that dogs with larger pelvises tended to have smaller NAs and in turn were more likely to have CHD. It is well-known that large-breed dogs show a higher prevalence of CHD compared to smaller breeds [29], which may be attributable to larger pelvises with larger femoral heads and smaller NAs. There is also a strong positive correlation of relative body length with a higher prevalence of CHD in certain dog breeds [30]. In a recent study, investigators [31] developed and validated a new index (Hip Congruency Index; HCI) to assess hip joint congruity and to incorporate this parameter into an artificial intelligence algorithm. The CFH was related to the acetabular area, and the resulting index decreased gradually with statistically significant differences between all FCI categories.

In the present study, hip joints were evaluated for dysplasia based on FCI criteria from A to E [3] for every hip joint separately, as hip dysplasia expression may differ between hips [19] and, therefore, the relationship between FHA/CFH and CrCdAR length. To find the association between these parameters, related correlation coefficients were calculated. There was a strong positive correlation between FHA and CrCdAR length in all dog breeds and sexes. Thus, it can be expected that with larger femoral heads, the acetabulum becomes larger as well. However, FHA and FCI scores did not manifest a significant correlation in any group. The theory that aside from excessive laxity of joint-related soft tissue structures, reciprocal disproportional bony components could also contribute to incongruent joint conformation was not supported by the results of the present study.

5. Conclusions

FHA and CFH values are breed-specific and are both greater in normal males compared to females in GWP and GSD. FHA has a strong positive correlation with CrCdAR length, suggesting that bony components of the hip joints maintain a certain proportion

reciprocally. FCI hip score groups did not reveal a consistently significant difference concerning FHA and CFH. However, certain tendencies may encourage further studies with a larger and more balanced caseload.

Author Contributions: Conceptualization, D.S.I.; methodology, D.S.I.; software, M.P.; validation, B.T., D.S.I., M.P. and I.E.; formal analysis, M.P. and D.S.I.; investigation, M.P. and P.Y.; resources, D.S.I., M.K., K.v.P. and P.Y.; data curation, D.S.I., B.T., K.v.P. and M.K.; writing—original draft preparation, M.P. and D.S.I.; writing—review and editing, D.S.I. and M.P.; visualization, D.S.I. and M.P.; supervision, D.S.I.; project administration, D.S.I.; statistics, I.E. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Experimental Animals Local Ethics Committee of Bursa Uludag University (protocol code 2019-01/02 and 09.01.2019 date of approval).

Informed Consent Statement: Written informed consent has been obtained from the patient(s) to publish this paper.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Adams, W.M.; Dueland, R.T.; Meinen, J.; O'Brien, R.T.; Giuliano, E.; Nordheim, E.V. Early detection of canine hip dysplasia: Comparison of two palpation and five radiographic methods. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **1998**, *34*, 339–347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Merca, R.; Bockstahler, B.; Vezzoni, A.; Tichy, A.; Boano, S.; Vidoni, B. Canine hip dysplasia screening: Comparison of early evaluation to final grading in 231 dogs with Fédération Cynologique Internationale A and B. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0233257. [[CrossRef](#)]
- Flückiger, M. Scoring Radiographs for Canine Hip Dysplasia—the Big Three Organisations in the World. *Eur. J. Companion Anim. Pract.* **2007**, *17*, 135–140.
- Kyriazis, A.; Prassinou, N.N. Canine Hip Dysplasia I: Aetiopathogenesis & Diagnostic Approach. *Hell. J. Companion Anim. Med.* **2016**, *5*, 22–47.
- Tellhelm, B.; Genevois, J.P.; Hazewinkel, H. Film Reading Session 3: Congruency/Incongruency, Craniolateral Rim, Subchondral Bone. In Proceedings of the FCI Hip Dysplasia Conference, Copenhagen, Denmark, 24–25 May 2022.
- Janssens, L.; De Ridder, M.; Verhoeven, G.; Gielen, I.; Van Bree, H. Comparing Norberg angle, linear femoral overlap and surface femoral overlap in radiographic assessment of the canine hip joint. *J. Small Anim. Pract.* **2014**, *55*, 135–138. [[CrossRef](#)]
- Butler, J.R.; Gambino, J. Canine Hip Dysplasia: Diagnostic Imaging. *Vet. Clin. N. Am. Small Anim. Pract.* **2017**, *47*, 777–793. [[CrossRef](#)]
- Tomlinson, J.L.; Johnson, J.C. Quantification of measurement of femoral head coverage and Norberg angle within and among four breeds of dogs. *Am. J. Vet. Res.* **2000**, *61*, 1492–1500. [[CrossRef](#)]
- Tomlinson, J.L.; Cook, J.L. Effects of degree of acetabular rotation after triple pelvic osteotomy on the position of the femoral head in relationship to the acetabulum. *Vet. Surg.* **2002**, *31*, 398–403. [[CrossRef](#)]
- Willemsen, K.; Tryfonidou, M.; Sakkas, R.; Castelein, R.M.; Zadpoor, A.A.; Seevinck, P.; Weinans, H.; Meij, B.; van der Wal, B.C.H. Patient-specific 3D-printed shelf implant for the treatment of hip dysplasia: Anatomical and biomechanical outcomes in a canine model. *J. Orthop. Res.* **2022**, *40*, 1154–1162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wigger, A.; Tellhelm, B.; Kramer, M.; Rudolf, H. Influence of Femoral Head and Neck Conformation on Hip Dysplasia in the German Shepherd Dog. *Vet. Radiol. Ultrasound* **2008**, *49*, 243–248. [[CrossRef](#)]
- McEvoy, F.J.; Proschowsky, H.F.; Müller, A.V.; Moorman, L.; Bender-Koch, J.; Svalastoga, E.L.; Frelsen, J.; Nielsen, D.H. Deep transfer learning can be used for the detection of hip joints in pelvis radiographs and the classification of their hip dysplasia status. *Vet. Radiol. Ultrasound* **2021**, *62*, 387–393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- LaFond, E.; Breur, G.J.; Austin, C.C. Breed Susceptibility for Developmental Orthopedic Diseases in Dogs. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **2002**, *38*, 467–477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- King, M.D. Etiopathogenesis of Canine Hip Dysplasia, Prevalence, and Genetics. *Vet. Clin. N. Am. Small Anim. Pract.* **2017**, *47*, 753–767. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Morgan, S.J. The Pathology of Canine Hip Dysplasia. *Vet. Clin. N. Am. Small Anim. Pract.* **1992**, *22*, 541–550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Martin, S.W.; Kirby, K.; Pennock, P.W. Canine hip dysplasia: Breed effects. *Can. Vet. J.* **1980**, *21*, 293–296.
- Bell, J.; Cavanagh, K.; Tilley, L.; Smith, F.W. *Veterinary Medical Guide to Dog and Cat Breeds*, 1st ed.; Teton NewMedia: Jackson, WY, USA, 2012.

18. Ohlerth, S.; Geiser, B.; Flückiger, M.; Geissbühler, U. Prevalence of Canine Hip Dysplasia in Switzerland between 1995 and 2016—A Retrospective Study in 5 Common Large Breeds. *Front. Vet. Sci.* **2019**, *6*, 378. [[CrossRef](#)]
19. Loder, R.T.; Todhunter, R.J. The Demographics of Canine Hip Dysplasia in the United States and Canada. *J. Vet.-Med.* **2017**, *2017*, 5723476. [[CrossRef](#)]
20. Pascual-Garrido, C.; Guilak, F.; Rai, M.F.; Harris, M.D.; Lopez, M.J.; Todhunter, R.J.; Clohisy, J.C. Canine hip dysplasia: A natural animal model for human developmental dysplasia of the hip. *J. Orthop. Res.* **2018**, *36*, 1807–1817. [[CrossRef](#)]
21. Willemsen, K.; Möring, M.M.; Harlianto, N.I.; Tryfonidou, M.A.; van der Wal, B.C.H.; Weinans, H.; Meij, B.P.; Sakkera, R.J.B. Comparing Hip Dysplasia in Dogs and Humans: A Review. *Front. Vet. Sci.* **2021**, *8*, 791434. [[CrossRef](#)]
22. Smith, G.K.; Mayhew, P.D.; Kapatkin, A.S.; McKelvie, P.J.; Shofer, F.S.; Gregor, T.P. Evaluation of risk factors for degenerative joint disease associated with hip dysplasia in German Shepherd Dogs, Golden Retrievers, Labrador Retrievers, and Rottweilers. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2001**, *219*, 1719–1724. [[CrossRef](#)]
23. Ajadi, R.A.; Sanni, J.L.; Sobayo, E.L. Evaluation of Radiographic Coxofemoral Measurements in Boerboel Dogs. *Folia Vet.* **2018**, *62*, 66–73. [[CrossRef](#)]
24. Smith, G.K.; Karge, G.T.; Angello, K.A. Pathogenesis, Diagnosis, and Control of Canine Hip Dysplasia. In *Veterinary Surgery: Small Animal*; Tobias, K.M., Johnson, S.A., Eds.; Saunders/Elsevier: St. Louis, MO, USA, 2012; Volume 1, pp. 824–848.
25. Culp, W.T.N.; Kapatkin, A.S.; Gregor, T.P.; Powers, M.Y.; McKelvie, P.J.; Smith, G.K. Evaluation of the Norberg Angle Threshold: A Comparison of Norberg Angle and Distraction Index as Measures of Coxofemoral Degenerative Joint Disease Susceptibility in Seven Breeds of Dogs. *Vet. Surg.* **2006**, *35*, 453–459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Gaspar, A.R.; Hayes, G.; Ginja, C.; Ginja, M.M.; Todhunter, R.J. The Norberg angle is not an accurate predictor of canine hip conformation based on the distraction index and the dorsolateral subluxation score. *Prev. Vet. Med.* **2016**, *135*, 47–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Mostafa, A.A.; Nahla, M.A.; Ali, K.M.; Berry, C.R. Modified FCI (Fédération Cynologique Internationale) Scoring of the Coxofemoral Joint in Labrador Retrievers without and with Hip Dysplasia. *Front. Vet. Sci.* **2022**, *9*, 800237. [[CrossRef](#)]
28. Fealey, M.J.; Li, J.; Todhunter, R.J.E.; Krotscheck, U.; Hayashi, K.; McConkey, M.J.; Boyko, A.R.; Hayward, J.J.; Todhunter, R.J. Genetic mapping of principal components of canine pelvic morphology. *Canine Genet. Epidemiol.* **2017**, *4*, 4. [[CrossRef](#)]
29. Witsberger, T.H.; Villamil, J.A.; Schultz, L.G.; Hahn, A.W.; Cook, J.L. Prevalence of and risk factors for hip dysplasia and cranial cruciate ligament deficiency in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2008**, *232*, 1818–1824. [[CrossRef](#)]
30. Roberts, T.; McGreevy, P.D. Selection for breed-specific long-bodied phenotypes is associated with increased expression of canine hip dysplasia. *Vet. J.* **2010**, *183*, 266–272. [[CrossRef](#)]
31. Franco-Gonçalo, P.; Moreira da Silva, D.; Leite, P.; Alves-Pimenta, S.; Colaço, B.; Ferreira, M.; Gonçalves, L.; Filipe, V.; McEvoy, F.; Ginja, M. Acetabular Coverage Area Occupied by the Femoral Head as an Indicator of Hip Congruency. *Animals* **2022**, *12*, 2201. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Magnetic Resonance Imaging Assessment of Intra-Articular Structures in the Canine Stifle Joint after Implantation of a Titanium Tibial Plateau Levelling Osteotomy Plate

Christian Feichtenschlager¹ Martin Gerwing¹ Klaus Failing² Christine Peppler¹ Andreas Kása³
Martin Kramer¹ Kerstin H. von Pückler¹

¹Department of Veterinary Clinical Science, Small Animal Clinic, Justus Liebig University, Giessen, Germany

²Unit for Biomathematics and Data Processing, Faculty of Veterinary Medicine, Justus Liebig University, Giessen, Germany

³Kleintierklinik Dres. Kasa, Lörrach, Germany

Address for correspondence Christian Feichtenschlager, Dr. med vet, Department of Veterinary Clinical Science, Small Animal Clinic, Justus Liebig University Giessen, Frankfurter Straße 108, 35392 Giessen, Germany (e-mail: c.feichtenschlager@gmx.net).

Vet Comp Orthop Traumatol 2018;31:261–272.

Abstract

Objectives To determine the effectiveness of magnetic resonance imaging (MRI) in the evaluation of anatomical stifle structures with respect to implant positioning after tibial plateau levelling osteotomy (TPLO) using a titanium plate.

Methods Selected sagittal and dorsal sequences of pre- and postoperative MRI (1.0 T scanner) of 13 paired ($n = 26$) sound cadaveric stifle joints were evaluated. The effect of susceptibility artifact on adjacent anatomical stifle structures was graded from 0 to 5. The impact of implant positioning regarding assessment score was calculated using Spearman's rank correlation coefficient.

Results Sagittal turbo spin echo (TSE)-acquired images enabled interpretation of most soft tissue, osseous and cartilage structures without detrimental effect of susceptibility artifact distortions. In T2-weighted TSE images, the cranial cruciate ligament and caudal horn of the medial meniscus could be evaluated, independent of implant position, without any susceptibility artifact in all specimens. T2-weighted fast field echo, water selective, balanced fast field echo and short tau inversion recovery were most markedly affected by susceptibility artifact.

Clinical Significance In selected TSE sequences, MRI allows evaluation of critical intra-articular structures after titanium TPLO plate implantation. Further investigations with confirmed stifle pathologies in dogs are required, to evaluate the accuracy of MRI after TPLO in clinical cases in this context.

Keywords

- ▶ titanium TPLO plate
- ▶ susceptibility artifact
- ▶ cranial cruciate ligament rupture
- ▶ dog
- ▶ magnetic resonance imaging

Introduction

Cranial cruciate ligament rupture is a common cause of hind limb lameness in dogs of all breeds and results in cranial subluxation of the tibia.¹ Currently, tibial plateau levelling osteotomy (TPLO) is one of the most commonly used techniques to treat cranial cruciate ligament-deficient stifle joints in dogs.^{2,3}

Postoperative meniscal injury is a reported complication of TPLO procedures, with an incidence of 0.7 to 13%.^{4–7} Affected animals are usually presented with acute onset of lameness during the rehabilitation phase or else if they have not improved adequately after surgery. Presumed causes for postoperative meniscal tears are ongoing stifle joint instability and

received

November 14, 2017

accepted after revision

March 17, 2018

published online

June 2, 2018

© 2018 Georg Thieme Verlag KG
Stuttgart · New York

DOI <https://doi.org/10.1055/s-0038-1647248>.
ISSN 0932-0814.

Table 1 Magnetic resonance imaging settings used in the present study

Sequence	Plane	TR (ms)	TE (ms)	Slice gap (mm)	Slice thickness (mm)	Acquisition matrix size	TSE factor (ETL)	NEX	FOV (mm)
T2W TSE	Sagittal	4142	108	2.7	2.5	288 × 212	11	6	170
T1W TSE	Dorsal	1736	14	3	3	320 × 224	5	3	170
T2W FFE	Sagittal	450	10	2.2	2	288 × 202	0	4	180
PDW TSE	Sagittal	1800	30	3.5	2.5	256 × 192	3	4	210
T1W TSE Fat sat	Sagittal	2204	14	2.8	2.5	320 × 237	5	4	190
WATS	Sagittal	25	13	0.85	1.7	304 × 304	0	2	170
STIR long TE	Dorsal	2500	50	3	3	208 × 133	6	3	170
B-FFE	Sagittal	11	5.6	1	2	272 × 272	0	4	180

Abbreviations: B-FFE, balanced fast field echo; ETL, echo train length; FFE, fast field echo; FOV, field of view; NEX, number of excitation; PDW, proton-density-weighted; STIR, short tau inversion recovery; T2W, T2-weighted; TE, echo time; TR, repetition time; TSE, turbo spin echo; WATS, water-selective excitation.

progression of a tear that was not diagnosed at the time of initial surgery.⁸ The diagnosis of a postoperative meniscal tear by arthrotomy or arthroscopy can be challenging if the articular surface is not affected. In the presence of interstitial meniscal lesions, arthrotomy or arthroscopy is not useful and magnetic resonance imaging (MRI) is required for diagnosis.⁹ In addition to being non-invasive, MRI is the gold standard for detecting meniscal tears in human medicine.¹⁰ A further benefit of stifle MRI investigation in dogs that are presented with the complaint of lameness after surgical treatment of cranial cruciate ligament insufficiency is the assessment of muscular and ligamentous

pathologies.^{11,12} However, a profound disadvantage of MRI is that metallic implants close to the stifle joint may engender susceptibility artifacts, which may negatively influence the appearance of adjacent anatomical structures.¹³ In a canine cadaveric stifle study, David and colleagues demonstrated that ferromagnetic stainless steel TPLO implants produce severe susceptibility artifacts, rendering sufficient evaluation of the menisci unfeasible. In contrast, susceptibility artifacts provoked by titanium implants in tibial tuberosity advancement did not interfere with assessment of intra-articular structures.¹⁴ Similar results have been reported; in two investigations, the presence of susceptibility artifacts after tibial tuberosity advancement did not affect evaluation of cruciate and meniscal lesions.^{15,16}

Recently, titanium alloy TPLO implant systems have been developed and clinically applied. With respect to infection susceptibility and implant biocompatibility, titanium is reported to be superior to stainless steel products.^{17,18} However, to date, there are no reports of postoperative complications and outcomes after implementing titanium TPLO plates in dogs.

The purpose of the present prospective study was to evaluate anatomical stifle structures with MRI after application of a titanium TPLO plate, using various clinically applicable sequences at 1.0 T under consideration of plate positioning. To the authors' knowledge, there are no data available that predict the extent of susceptibility artifacts related to titanium TPLO implants in dogs.

Materials and Methods

Specimen Collection

Thirteen paired ($n = 26$) cadaveric stifle joints were disarticulated at the coxofemoral joint from skeletally mature dogs euthanized for reasons unrelated to this study. The dogs were of diverse breeds, and the body weight was > 25 kg (range: 25.8–39.5 kg). Mediolateral and caudocranial stifle radiographs (60 kVp, 6.3 mAs) were performed to rule out



Fig. 1 Custom made left titanium tibial plateau levelling osteotomy implant.



Fig. 2 (A) Caudocranial view of a left stifle joint specimen. The dotted black line represents the distance between the proximal rim of the tibial plateau levelling osteotomy plate and the most proximal medial and lateral margins of the tibial condyles (4 mm). (B) Postoperative radiograph of a left stifle specimen in mediolateral view.

osteoarthritis and other pathologies affecting the stifle joint, and to estimate tibial plateau angle (TPA) (median: 26°; range: 22–29°). The collected hindlimbs were individually bagged, frozen at –20°C and thawed at room temperature 24 hours before presurgical MRI (1.0 T scanner; Gyroscan Intera; Philips, Hamburg, Germany) was performed. In all specimens, positioning aids were used to standardize positioning at the same isocentre. The stifles were imaged in a 90° flexed position with the lateral aspect placed against the table and the tibia oriented along the longitudinal axis of the scanner.¹⁹ This enabled alignment of the long axis of the plate with the magnetic field. A solenoid coil was placed centrally on the stifle joint and the MRI sequences listed in ►Table 1 were conducted. Sagittal plane images were acquired parallel to the axis of the femur condyles and the dorsal image plane was oriented parallel to the patellar ligament.

Surgical Implants and Technique

The TPLO implant (Litos tifix; litos/GmbH, Ahrensburg, Germany) used in this study was custom made from pure

Table 2 Magnetic resonance imaging susceptibility artifact grading scheme

Grade	Interpretation
0	Appearance of structure unaffected
1	Adjacent artifact mildly affecting structure
2	Structure moderately affected by artifact
3	Structure severely affected by artifact
4	Structure not assessable, complete obliteration by artifact
5	Structure not assessable, other reasons than artifact

titanium; we have used this implant clinically at our institution (►Fig. 1). In all stifles, a multidirectional (possible screw angulation: 0–15°) locking screw system with precontoured plates of one size (length: 60 mm, width: 20 mm, height: 4 mm) and 4.0 mm self-tapping titanium screws were used. The screw length varied from 24 to 40 mm in the tibial plateau segment and from 18 to 34 mm in the distal tibial segment. After clipping the surgical site, a standard TPLO procedure was performed on each stifle by a highly experienced orthopaedic surgeon (M.G.). Arthrotomy was not performed in any specimen during the surgical procedure, to avoid intra-articular gas entrapment. The osteotomized tibial plateau segment was temporarily fixed with a 1.25-mm Kirschner wire during consideration of the estimated rotation distance (target value for TPA: 5°), and the plate positioning was assessed by mediolateral fluoroscopy (C-arm, Philips BV 25 gold; Philips GmbH, Hamburg, Germany). With respect to plate positioning, the stifles were randomly divided in two groups: in one group, the proximal edge of the plate was oriented close to the articular surface of the medial tibial plateau, and in the other group, the plate was placed as distal as possible to the osteotomy side. Care was taken to avoid intra-articular screw placement or insertion of screws into the osteotomy gap, in each of the two groups, respectively. After insertion of all screws, the Kirschner wire was removed and closure was done under compression of the surgical site to reduce residual gas between the tissue layers.

Postsurgical Radiographs and Magnetic Resonance Imaging

Following the TPLO procedure, radiographs were obtained for measuring the distance between the proximal rim of the TPLO plate and the most proximal medial and lateral margins



Fig. 3 Sagittal T2-weighted turbo spin echo images of a stifle specimen following surgery (implant oriented close to the joint). Susceptibility artifact affects the tibia in form of signal void and areas of signal intensity. (A) The appearance of the cranial cruciate ligament (asterisk) is unaffected by susceptibility artifact. (B) A large signal void covers most of the medullary bone of the medial tibial plateau. The cranial and caudal horn of the medial meniscus (arrows) as well as the popliteal muscle and medial gastrocnemius muscle are unaffected.

of the tibial plateau in caudocranial projection, and to determine postoperative TPA (median: 5°; range: 3–9°) (►Fig. 2). Both measurements were ascertained using a clinical software program (easyVET; VetZ, Isernhagen, Germany) through application of a calibration tool.

Postoperative MRI were acquired utilizing the same sequences and stifle positioning as for preoperative scans. Consensus review of MRI findings was performed by a board-certified radiologist (K.H.v.P.) and a second-year surgical resident (C.F.) using a dedicated imaging software (OsiriX v.3.9.1; Pixmeo Sarl, Geneva, Switzerland). Soft tissue structures assessed included the cranial and the caudal cruciate ligament, the cranial and the caudal horn of the medial and lateral menisci, the patellar ligament, the synovial joint capsule (cranial and caudal aspect on sagittal images), the infrapatellar fat pad, the long digital extensor tendon, the popliteal muscle, and the medial and lateral heads of gastrocnemius muscle. Evaluated osseous structures included the lateral and medial femoral condyle, the intercondylar fossa, the lateral and medial aspect of the tibial plateau (cortical and medullary bone), the fabellae, and the patella. Articular cartilage including the lateral and medial aspect of the tibial plateau and lateral and medial femoral condyles^{20,21} was evaluated. Distortion of anatomical structures and areas of signal void were defined as susceptibility artifacts. The appearance of stifle structures in postoperative MRI were evaluated and scored with respect to the influence by susceptibility artifacts associated with implants using a grading scheme (►Table 2); preoperative MRI were used as a reference. A structure was deemed to be satisfactorily evaluated if scored as 0 (appearance unaffected).

Statistical Analysis

Descriptive statistics were performed to compare the occurrence of susceptibility artifacts affecting soft tissue, osseous, and cartilage structures in sagittal (T2-weighted [T2W] turbo spin echo [TSE], T2W fast field echo [FFE], proton-density-weighted [PDW] TSE, T1W TSE, water-selective excitation [WATS] and balanced FFE [B-FFE]) and dorsal (T1W TSE and short tau inversion recovery [STIR] long echo time) MRIs in different emphasis. Friedman's test was used to statistically evaluate the comparison of the artifact grading score for the different anatomical structures between the six sagittal sequences, and exact Wilcoxon's signed rank test was performed to statistically evaluate the comparison between the two dorsal sequences. To detect a statistical correlation between the impact of susceptibility artifact on anatomical structures and plate positioning, Spearman's rank correlation coefficient (r_s) and the associated p value were determined. Statistical analyses were performed using a commercially available software (BMDP/Dynamic, Release 8.1; StatXact Version 9.0.0) and p values ≤ 0.05 were considered to be significant.

Results

Preoperative MRI and radiographs, and postoperative stifle inspections following MRI investigation, did not reveal pathological findings in any specimen. Postoperative stifle radiographs in two planes demonstrated satisfactory placement of the implants (►Fig. 2A and 2B). The mean distances between the proximal edge of the plate and the most proximal osseous margin of the tibia were 2.5 mm (proximal plate group) and 9.5 mm (distal plate group), respectively.

Table 3 Percentage of soft tissue structures unaffected from susceptibility artifact in investigated MRI sequences (sagittal and dorsal)

	T2W TSE Sagittal		T2W FFE Sagittal		PDW TSE Sagittal		T1W TSE Sagittal		WATS Sagittal		B-FFE Sagittal		T1W TSE Dorsal		STIR Dorsal	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
CrCL ^a	26	100	11	42	24	92	23	88	14	54	4	15	26	100	24	92
CdCL ^b	26	100	13	50	26	100	26	100	13	50	11	42	26	100	24	92
latMeCr ^c	25	96	12	46	24	92	23	88	18	69	11	42	25	96	17	65
latMeCd ^d	25	96	21	81	24	92	25	96	20	77	20	77	26	100	18	69
meMeCr ^e	24	92	12	46	23	88	24	92	12	46	5	19	24	92	1	4
meMeCd ^f	26	100	15	58	25	96	25	96	14	54	8	31	25	96	1	4
patTen ^g	24	92	5	19	21	81	16	62	7	27	6	23	8	31	1	4
Fatpad ^h	24	92	6	23	21	81	*	*	*	*	1	4	25	96	*	*
jCapCr ⁱ	24	92	6	23	23	88	21	81	10	38	7	27	2	8	1	4
jCapCd ^j	26	100	19	73	26	100	26	100	18	69	9	35	26	100	22	85
digExt ^k	24	92	15	58	20	77	18	69	16	62	16	62	24	92	17	65
medGas ^l	25	96	14	54	25	96	10	38	15	58	2	8	24	92	20	77
latGas ^m	26	100	22	85	25	96	15	58	23	88	11	42	25	96	20	77
popIM ⁿ	5	19	0	0	1	4	0	0	0	0	0	0	9	35	2	8

Abbreviations: B-FFE, balanced fast field echo; FFE, fast field echo; MRI, magnetic resonance imaging; PDW, proton-density-weighted; STIR, short tau inversion recovery; T1W, T1-weighted; TSE, turbo spin echo; WATS, water-selective excitation.

n = 26, except in STIR dorsal: n = 25.

*Fat-suppressed sequences.

^aCranial cruciate ligament.

^bCaudal cruciate ligament.

^cCranial horn of the lateral meniscus.

^dCaudal horn of the lateral meniscus.

^eCranial horn of the medial meniscus.

^fCaudal horn of the medial meniscus.

^gPatellar tendon.

^hInfrapatellar fat pad.

ⁱCranial aspect of the synovial joint capsule.

^jCaudal aspect of the synovial joint capsule.

^kLong digital extensor tendon.

^lMedial gastrocnemius muscle.

^mLateral gastrocnemius muscle.

ⁿPopliteal muscle.

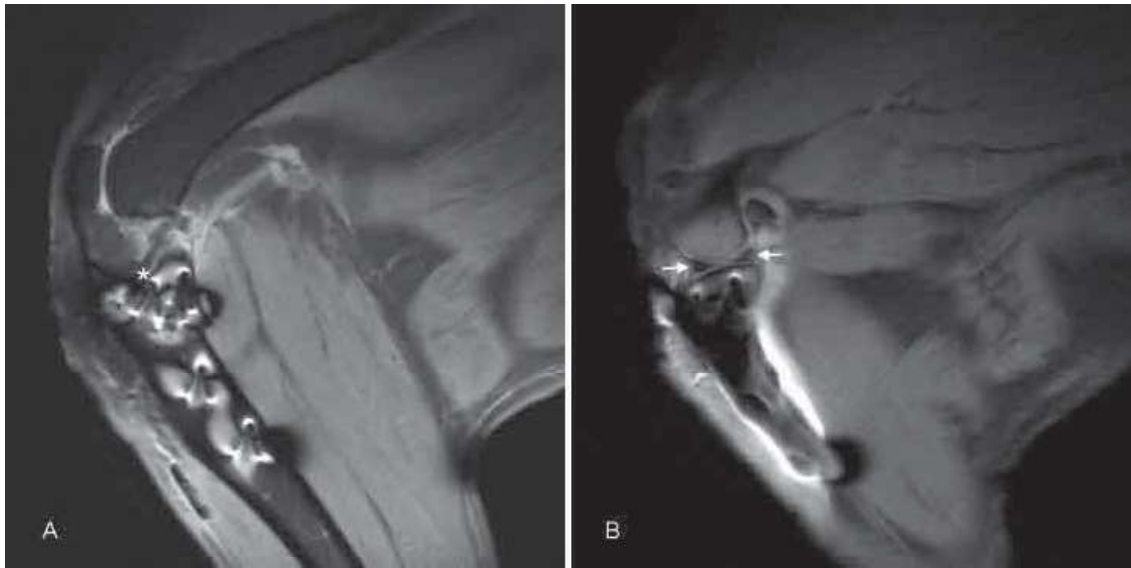


Fig. 4 Examples of muscle structures affected by susceptibility artifact. Sagittal T1-weighted turbo spin echo images showing (A) the popliteal muscle and (B) the medial gastrocnemius muscle following tibial plateau levelling osteotomy. The occurrence of susceptibility artifact associated with tibial plateau levelling osteotomy implants is observed as a signal void superimposed focally in both muscular structures. Cranial cruciate ligament (asterisk) as well as cranial and caudal horn of the medial meniscus (arrows) is unaffected by susceptibility artifact.

To obtain a better overview of the results, data were divided with respect to anatomical segment and are presented in the following sections.

Soft Tissue Structures

In sagittally acquired T2W TSE, the cruciate ligaments and the caudal horn of the medial meniscus were evaluated without any susceptibility artifact in all specimens (►Fig. 3). In other sagittal TSE sequences (PDW, T1W), the

same structures were affected by susceptibility artifact in up to 22% of the images (►Table 3). On TSE sequences, the muscular structures (lateral and medial heads of the gastrocnemius muscle, popliteal muscle, and the long digital extensor muscle) were mostly affected by susceptibility artifact in T1W (sagittal) (►Fig. 4). However, satisfactory evaluation of the popliteal muscle was not possible in any plane. The sagittal T2W FFE, WATS and B-FFE sequences and the dorsal STIR sequences were markedly affected by

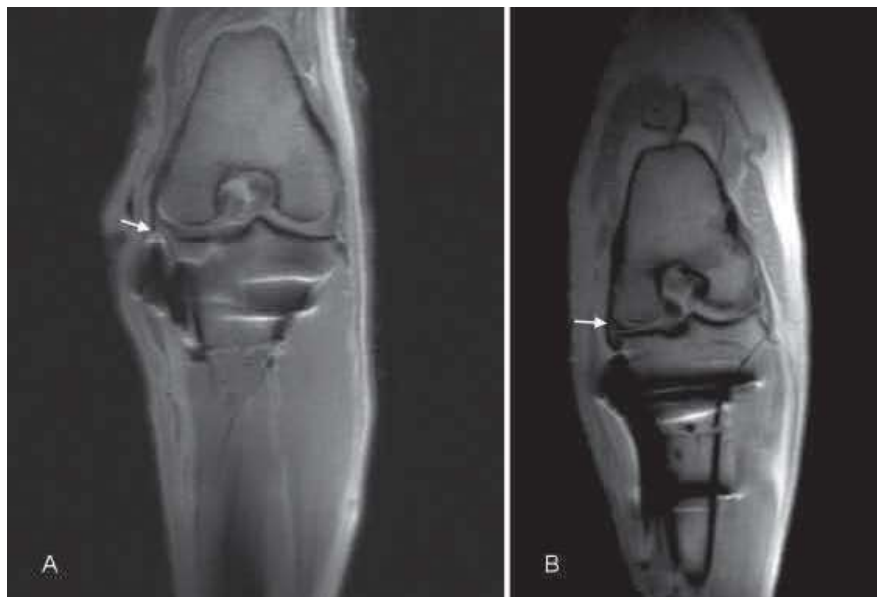


Fig. 5 Dorsal T1-weighted turbo spin echo images of two different stifle specimens following tibial plateau levelling osteotomy. (A) The titanium plate is fixed close to the joint space and signal void generated from the implants mildly affecting the edge of the cranial horn of the medial meniscus (arrow). (B) The plate is positioned close to the osteotomy gap. Distortion of intra-articular anatomical structures (cranial horn of the medial meniscus is marked by an arrow) by susceptibility artifact is not observed.

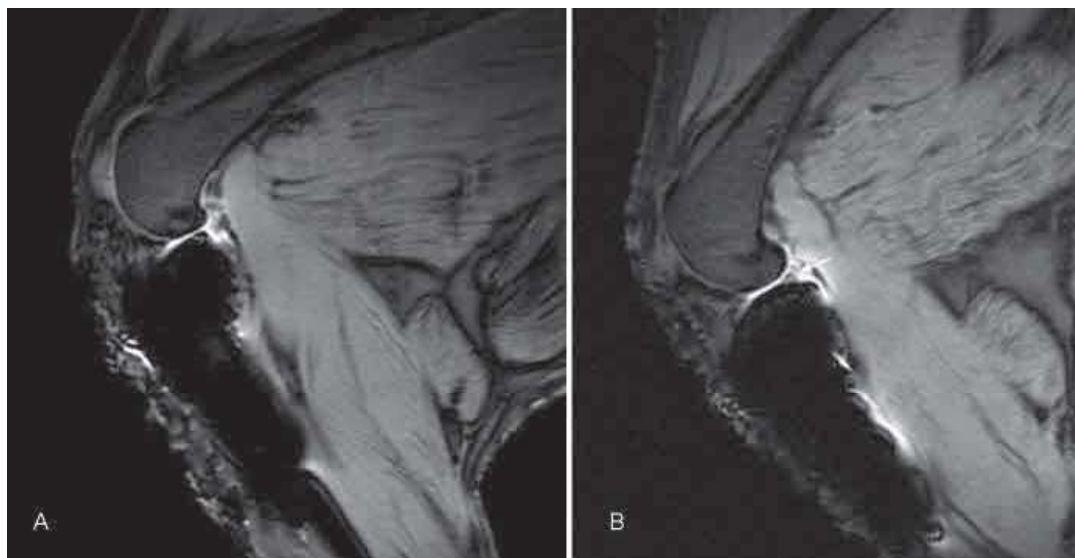


Fig. 6 Sagittal T2-weighted fast field echo images of two different stifle specimen following tibial plateau levelling osteotomy showing the medial meniscus. (A) The titanium plate is positioned close to the joint, which causes complete obliteration of the caudal horn of the medial meniscus by susceptibility artifact. (B) In contrast, a specimen with a wide clearance between plate and joint space is imaged. The edges of the caudal horn of the medial meniscus (arrow) are well separated from the signal void caused by the implants.

susceptibility artifact (►Table 3). Regarding plate positioning and influence on assessment of soft tissue structures, no significant influence was seen in sagittal T2W TSE images. In up to two structures, a significant effect was observed in following sagittal sequences: PDW (cranial horn of the medial meniscus [meMeCr]: $p = 0.0427$), T1W TSE (cranial aspect of the synovial joint capsule [jCapCr]: $p = 0.0139$), WATS (cranial horn of the lateral meniscus [latMeCr]: $p = 0.007$; jCapCr: $p = 0.0142$) and dorsal sequences: T1W TSE (meMeCr: $p = 0.0308$) (►Fig. 5) and STIR (meMeCr: $p = 0.0071$; caudal horn of the medial meniscus [meMeCd]: $p = 0.0103$). Sequences most commonly affected by plate positioning and impairment of soft tissue structures were T2W FFE (►Fig. 6) and B-FFE (►Table 4). The appearance of susceptibility artifacts acquired in B-FFE images differs profoundly from other sequences and is characterized by multi-

ple clearly arranged semicircle hypointense lines surrounding a rounded hypointense centrum (►Fig. 7). The highly pronounced extension of the “flower-shaped” signal void impairs the assessment of soft tissue structures. In the different sagittal sequences for individual anatomical soft tissue structures, a significant effect of sequence type was found in the grading scores. In contrast, in dorsal sequences, only the following structures showed significant results: latMeCr and caudal horn of the lateral meniscus (both $p = 0.0156$), meMeCr and meMeCd (both $p < 0.0001$) and popliteal muscle ($p = 0.002$).

Osseous Structures

On the evaluation of osseous structures immediately adjacent to the implant, the lateral and medial portions of the medullary tibial plateau were highly affected by

Table 4 Influence of plate positioning and distortion of soft tissue structures in sagittal planes

	Spearman's rank correlation analysis			
	B-FFE		T2W FFE	
	rs	p-Value	rs	p-Value
CrCL	-0.644	0.0005	-0.668	0.0007
CdCL	-0.671	0.0003	-0.594	0.0022
latMeCr	-0.636	0.0007	-0.691	0.0002
latMeCd	-0.456	0.0191	-0.422	0.0314
meMeCr	-0.545	0.0045	-0.812	0.0000
meMeCd	-0.617	0.0010	-0.785	0.0000
jCapCd	-0.450	0.0218	^a	^a

^aValues not significant, abbreviations are listed in ►Table 3.



Fig. 7 Sagittal balanced fast field echo image of a stifle specimen following tibial plateau levelling osteotomy. The extended 'flower shape' like appearance of susceptibility artifact influences most of the anatomical structures of the stifle.

susceptibility artifact in all sequences and planes (► **Table 5**). In T2W TSE sagittal images, the medial cortical bone of the tibial plateau was more often evaluated satisfactorily (81%) compared with the lateral cortex (73%). ► **Table 6** shows the significant differences in plate positioning/distance and grading among anatomical structures. Except for the medial cortical tibial plateau in sagittal plane T1W images ($p = 0.1903$), the assessment of both medial and lateral cortical aspects of the tibial plateau was significantly influenced by plate positioning/distance in all TSE sequences. The only osseous structure that showed no significant values when comparing the acquired sequences in sagittal plane was the patella ($p = 0.5494$). When performing Wilcoxon's rank-test to compare dorsal planes, the medial femoral condyle ($p = 0.0156$), and the medial ($p < 0.0001$) and lateral ($p = 0.0117$) cortical tibia plateau displayed a significant difference.

Cartilage Structures

The T2-weighted TSE images showed the highest number of medial (88%) and lateral (85%) cartilage of the tibial plateau unaffected by susceptibility artifact compared with other sagittal plane sequences (► **Table 7**). The only sequences in sagittal plane that showed no significant relationship between plate positioning/distance and deterioration of the medial tibial plateau cartilage by susceptibility artifact were WATS ($p = 0.0923$) and T1W TSE ($p = 0.2855$). In all other sagittally oriented sequences (► **Table 8**) and in STIR dorsal sequences (medial aspect of the tibial plateau [tibPmCa]: $p = 0.0212$, lateral aspect of the tibial plateau [tibPICa]: $p = 0.0131$), assessment of the tibial cartilage was significantly impaired by plate positioning/distance. For the different cartilage structures, the comparison of all sagittal

plane sequences revealed a highly significant effect of sequence type ($p < 0.0001$). Except for the lateral femoral condyle ($p = 0.125$), a significant difference in determining articular cartilage affected by susceptibility artifact was found when comparing dorsal sequences (T1W TSE and STIR; medial femoral condyle: $p = 0.001$, tibPmCa: $p < 0.0001$, tibPICa: $p = 0.0313$).

Discussion

Our study shows that MRI, especially TSE sequences (T2W, PDW, T1W) conducted with a 1.0 T scanner, allows evaluation of intra-articular structures in the canine stifle following surgical insertion of a titanium TPLO implant. In contrast, ferromagnetic stainless steel TPLO implants generated extensive susceptibility artifacts, such that most stifle structures could not be assessed using routine MRI sequences.¹⁴ Especially in dogs with poor clinical outcome after TPLO and suspected late meniscal tear, MRI is noninvasive and may be a useful investigative technique. In cases where the meniscal lesion does not reach the surface, MRI appears more useful than arthrotomy or arthroscopy.

The different sequences chosen in this study reflect the established imaging protocol for dogs with persistent lameness after stifle surgery. The following sequences are generally recommended to assess the stifle: T1W sagittal, T2W sagittal, PDW sagittal and transverse, STIR or fat-saturated T2W and PDW or T1W dorsal images.²²

A sagittally oriented T2W TSE sequence was used in the present study because of its known clinical value in assessing soft tissue structures such as the menisci, musculature and intra-articular filling, as well as synovial membrane and ligaments. This sequence is complemented by a T1W TSE sequence in dorsal orientation for the assessment of ligaments and osseous structures. The PDW sequences provided good anatomical detail in a study using high-field MRI in clinical cases of meniscal injury and allowed scanning within a reasonable period of time with a very high detection rate of altered signal.⁹ Surprisingly, 22% had artifacts due to distortion on T1W TSE and PDW while T2 TSE was unremarkable but an influence of sequence parameter (slice thickness, slice gap and field of view) cannot be ruled out.

A T2W FFE (gradient echo sequence) was included because previous studies reported its value in assessing the menisci; however, this sequence has been reported to be especially prone to susceptibility artifacts after stifle surgery.¹⁵ The lack of a 180° refocusing pulse increases the effect of magnetic field disturbances.

The STIR and other fat-suppression techniques are used to assess oedematous changes. This is invaluable in the detection of bone marrow lesions, such as hyperintensities at the origin of the cranial cruciate ligament after rupture or partial tear.

In addition, we included WATS and B-FFE sequences, which provide a very high spatial resolution. The WATS sequence was included because it is designed to show cartilage alterations. B-FFE sequences show very good detail due to thin slice thickness with T1 and T2 contrast.

Table 5 Percentage of osseous structures unaffected from susceptibility artifact in investigated MRI sequences (sagittal and dorsal)

	T2W TSE Sagittal		T2W FFE Sagittal		PDW TSE Sagittal		T1W TSE Sagittal		WATS Sagittal		B-FFE Sagittal		T1W TSE Dorsal		STIR Dorsal	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
medCond ^a	26	100	19	73	26	100	26	100	18	69	7	27	26	100	18	72
latCond ^b	24	92	20	77	25	96	25	96	20	77	12	46	26	100	23	92
intFos ^c	24	92	11	42	23	88	23	88	10	38	3	12	25	96	22	88
tibPmeC ^d	21	81	2	8	16	62	16	62	2	8	1	4	24	92	3	12
tibPmeM ^e	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
tibPlaC ^f	19	73	9	35	17	65	18	69	10	38	5	19	22	85	15	60
tibPlaM ^g	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	0	0	0	0	2	8
patella	26	100	25	96	26	100	26	100	26	100	25	96	26	100	25	100
fabellae	26	100	26	100	26	100	26	100	26	100	25	96	26	100	25	100

Abbreviations: B-FFE, balanced fast field echo; FFE, fast field echo; MRI, magnetic resonance imaging; PDW, proton-density-weighted; STIR, short tau inversion recovery; T1W, T1-weighted; TSE, turbo spin echo; WATS, water-selective excitation.

^an = 26, except in STIR dorsal: n = 25.

^bMedial femoral condyle.

^cLateral femoral condyle.

^dIntercondylar fossa.

^eCortical bone of the medial tibial plateau.

^fMedullary bone of the medial tibial plateau.

^gCortical bone of the lateral tibial plateau.

^hMedullary bone of the lateral tibial plateau.

Table 6 Influence of plate positioning and distortion of osseous structures in sagittal planes

Spearman's rank correlation analysis												
	B-FFE		T2W FFE		T2W TSE		PDW TSE		T1W TSE		WATS	
	rs	p-Value	rs	p-Value	rs	p-Value	rs	p-Value	rs	p-Value	rs	p-Value
tibPmeC	^a	0.0007	-0.634	0.0005	-0.618	0.0076	^a	0.0076	^a	0.0076	-0.433	0.0278
tibPmeM	^a	<0.0001	-0.737	<0.0001	-0.735	0.0035	^a	0.0035	-0.535	0.0052	^a	^a
tibPlaC	^a	0.0005	-0.480	0.0134	-0.489	0.0029	^a	0.0029	-0.522	0.0067	-0.620	0.0010
tibPlaM	^a	0.0014	-0.575	0.0026	-0.735	0.0035	^a	0.0035	-0.535	0.0052	^a	^a
medCond												
latCond												
intFos												

^aValues not significant, abbreviations are listed in ► **Table 5**.

Table 7 Percentage of cartilage structures unaffected from susceptibility artifact in investigated MRI sequences (sagittal and dorsal)

	T2W TSE Sagittal		T2W FFE Sagittal		PDW TSE Sagittal		T1W TSE Sagittal		WATS Sagittal		B-FFE Sagittal		T1W TSE Dorsal		STIR Dorsal	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
feConne ^a	26	100	20	77	26	100	26	100	15	58	6	23	26	100	21	84
feConla ^b	25	96	20	77	24	92	25	96	18	69	9	35	25	96	2	8
tibPmCa ^c	23	88	7	27	17	65	19	73	3	12	2	8	24	92	17	68
tibPlCa ^d	22	85	13	50	19	73	19	73	12	46	5	19	26	100	14	56

Abbreviations: B-FFE, balanced fast field echo; FFE, fast field echo; MRI, magnetic resonance imaging; PDW, proton-density-weighted; STIR, short tau inversion recovery; T1W, T1-weighted; TSE, turbo spin echo; WATS, water-selective excitation.

^an = 26, except in STIR dorsal: n = 25.

^bMedial femoral condyle.

^cLateral femoral condyle.

^dMedial aspect of the tibial plateau.

^eLateral aspect of the tibial plateau.

Table 8 Influence of plate positioning and distortion of cartilage structures in sagittal planes

	Spearman's rank correlation analysis											
	B-FFE		T2W FFE		T2W TSE		PDW TSE		WATS			
	rs	p-Value	rs	p-Value	rs	p-Value	rs	p-Value	rs	p-Value	rs	p-Value
feConme	-00.608	0.0012	-00.557	0.0030	a	a	a	a	a	a	a	a
feConla	-00.670	0.0003	-00.481	0.0129	a	a	a	a	a	a	a	0.0040
tibPmCa	-00.575	0.0026	-00.727	< 0.0001	-00.473	0.0119	-00.614	0.0011	a	a	a	a
tibPlCa	-00.584	0.0021	-00.754	< 0.0001	-00.552	0.0020	-00.576	0.0022	v00.691	v00.691	v00.691	0.0002

^aValues not significant, abbreviations are listed in ► **Table 7**.

In small dogs (<10 kg), the interpretation of small intra-articular structures in low-field MRI can be challenging because of insufficient resolution of MRI for assessing pathologies such as meniscal lesions.²³ The specimens in this study were collected from dogs > 25 kg because these implants cannot be used in smaller dogs. Additionally, the use of a high-field MRI, as in the present investigation, would substantially reduce the issue of insufficient resolution. For example, in some sequences, structures were scored as 5 (structure not assessable, reasons other than artifact) because the selected anatomical structure could not be fully evaluated. Potential reason for incomplete evaluation of a structure in some images in this study was the slice thickness used (partial volume artifact). It must be taken into account that the degradation of images associated with susceptibility artifact is proportional to the level of field strength.²⁴

The artifact extent is influenced by the implant positioning relative to the main magnetic field. If metallic implants were placed parallel to the magnetic field, a decreased artifact size would be observed.²⁴ In our study, titanium screws are fixed perpendicular to a titanium plate, resulting in an asymmetric construct type with implant orientation in two different directions. Considering that the plate is fixed closer to the articular structures of interest (menisci, cranial cruciate ligament) than are the screws, the stifle position was adjusted in such a way that the long axes of the plate were oriented parallel to the magnetic field to achieve decreased susceptibility artifact to the adjacent structures.

Previous studies have shown that titanium implants induce significantly smaller artifacts in MRI than stainless steel implants, and do not obstruct interpretation of either the menisci or the cruciate ligament in dogs.^{16,21,25,26} A study in which objects were scanned in a gelatin phantom demonstrated that a titanium total hip arthroplasty implant caused up to 70% less image distortion and signal voiding than a comparable stainless-steel implant.²⁷

This study was designed to address the ability of MRI to evaluate articular structures after insertion of titanium TPLO implants in dogs. We did not evaluate the diagnostic accuracy of MRI in detecting stifle pathologies in association with implant-induced susceptibility artifacts. The results indicate that MRI, under consideration of selected sequences, could be a useful non-invasive diagnostic technique in managing dogs with suspected meniscal pathology following TPLO.

In conclusion, MRI using TSE sequences (T1W, T2W, PDW) is a feasible diagnostic approach in stifles containing titanium TPLO implants. The assessment of intra-articular soft tissue structures such as cruciate ligaments and menisci was not influenced by the distance between the implant and joint space in these sequences. FFE, WATS and STIR did not allow satisfactory evaluation of most stifle anatomy, especially of intra-articular structures in cases where the plate was fixed close to the femorotibial joint space.

Conflict of Interest

None.

Funding

None.

Author Contributions

Christian Feichtenschlager and Kerstin H. von Pückler contributed to conception of study, study design, acquisition of data and data analysis and interpretation. Martin Gerwing contributed to study design and acquisition of data. Klaus Failing contributed to study design and data analysis and interpretation. Christine Peppler contributed to conception of study and study design. Andreas Kása and Martin Kramer contributed to conception of study. All authors drafted and revised and approved the submitted manuscript.

References

- Johnson JA, Austin C, Breur GJ. Incidence of canine appendicular musculoskeletal disorders in 16 veterinary teaching hospitals from 1980 through 1989. *Vet Comp Orthop Traumatol* 1994; 7:56–69
- Gatineau M, Dupuis J, Planté J, Moreau M. Retrospective study of 476 tibial plateau levelling osteotomy procedures. Rate of subsequent 'pivot shift', meniscal tear and other complications. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2011;24(05):333–341
- Fitzpatrick N, Solano MA. Predictive variables for complications after TPLO with stifle inspection by arthrotomy in 1000 consecutive dogs. *Vet Surg* 2010;39(04):460–474
- Thieman KM, Tomlinson JL, Fox DB, Cook C, Cook JL. Effect of meniscal release on rate of subsequent meniscal tears and owner-assessed outcome in dogs with cruciate disease treated with tibial plateau leveling osteotomy. *Vet Surg* 2006;35(08):705–710
- Cook JL, Luther JK, Beetem J, Karnes J, Cook CR. Clinical comparison of a novel extracapsular stabilization procedure and tibial plateau leveling osteotomy for treatment of cranial cruciate ligament deficiency in dogs. *Vet Surg* 2010;39(03):315–323
- Pacchiana PD, Morris E, Gillings SL, Jessen CR, Lipowitz AJ. Surgical and postoperative complications associated with tibial plateau leveling osteotomy in dogs with cranial cruciate ligament rupture: 397 cases (1998–2001). *J Am Vet Med Assoc* 2003;222(02):184–193
- Bergh MS, Peirone B. Complications of tibial plateau levelling osteotomy in dogs. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2012;25(05):349–358
- Case JB, Hulse D, Kerwin SC, Peycke LE. Meniscal injury following initial cranial cruciate ligament stabilization surgery in 26 dogs (29 stifles). *Vet Comp Orthop Traumatol* 2008;21(04):365–367
- Blond L, Thrall DE, Roe SC, Chailleux N, Robertson ID. Diagnostic accuracy of magnetic resonance imaging for meniscal tears in dogs affected with naturally occurring cranial cruciate ligament rupture. *Vet Radiol Ultrasound* 2008;49(05):425–431
- Oei EH, Ginai AZ, Hunink MG. MRI for traumatic knee injury: a review. *Semin Ultrasound CT MR* 2007;28(02):141–157
- Kaiser SM, Harms O, Konar M, et al. Clinical, radiographic, and magnetic resonance imaging findings of gastrocnemius musculotendinopathy in various dog breeds. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2016;29(06):515–521
- Haaland PJ, Sjöström L. Luxation of the long digital extensor tendon as a complication to tibial plateau levelling osteotomy. A presentation of four cases. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2007;20(03):224–226
- Hargreaves BA, Worters PW, Pauly KB, Pauly JM, Koch KM, Gold GE. Metal-induced artifacts in MRI. *Am J Roentgenol* 2011;197(03):547–555
- David FH, Grierson J, Lamb CR. Reducing susceptibility artefacts in magnetic resonance images of the canine stifle following surgery for cranial cruciate ligament deficiency. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2012;25(06):488–497
- Taylor-Brown F, Lamb CR, Tivers MS, Li A. Magnetic resonance imaging for detection of late meniscal tears in dogs following tibial tuberosity advancement for treatment of cranial cruciate ligament injury. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2014;27(02):141–146
- Barrett E, Barr F, Owen M, Bradley K. A retrospective study of the MRI findings in 18 dogs with stifle injuries. *J Small Anim Pract* 2009;50(09):448–455
- Pieske O, Geleng P, Zaspel J, Piltz S. Titanium alloy pins versus stainless steel pins in external fixation at the wrist: a randomized prospective study. *J Trauma* 2008;64(05):1275–1280
- Soultanis KC, Pyrovolou N, Zahos KA, et al. Late postoperative infection following spinal instrumentation: stainless steel versus titanium implants. *J Surg Orthop Adv* 2008;17(03):193–199
- Podadera J, Gavin P, Saveraid T, Hall E, Chau J, Makara M. Effects of stifle flexion angle and scan plane on visibility of the normal canine cranial cruciate ligament using low-field magnetic resonance imaging. *Vet Radiol Ultrasound* 2014;55(04):407–413
- Pujol E, Van Bree H, Cauzinille L, Poncet C, Gielen I, Bouvy B. Anatomic study of the canine stifle using low-field magnetic resonance imaging (MRI) and MRI arthrography. *Vet Surg* 2011; 40(04):395–401
- David FH, Grierson J, Lamb CR. Effects of surgical implants on high-field magnetic resonance images of the normal canine stifle. *Vet Radiol Ultrasound* 2012;53(03):280–288
- Sage JE, Gavin P. Musculoskeletal MRI. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2016;46(03):421–451, v
- Martig S, Konar M, Schmökel HG, et al. Low-field MRI and arthroscopy of meniscal lesions in ten dogs with experimentally induced cranial cruciate ligament insufficiency. *Vet Radiol Ultrasound* 2006;47(06):515–522
- Guermazi A, Miaux Y, Zaim S, Peterfy CG, White D, Genant HK. Metallic artefacts in MR imaging: effects of main field orientation and strength. *Clin Radiol* 2003;58(04):322–328
- Suh JS, Jeong EK, Shin KH, et al. Minimizing artifacts caused by metallic implants at MR imaging: experimental and clinical studies. *Am J Roentgenol* 1998;171(05):1207–1213
- Jones BG, Fosgate GT, Green EM, Habing AM, Hettlich BF. Magnetic resonance imaging susceptibility artifacts in the cervical vertebrae and spinal cord related to monocortical screw-polymethylmethacrylate implants in canine cadavers. *Am J Vet Res* 2017;78(04):458–464
- Sutherland-Smith J, Tilley B. Magnetic resonance imaging metallic artifact of commonly encountered surgical implants and foreign material. *Vet Radiol Ultrasound* 2012;53(03):312–317

Originalarbeiten zum Kapitel 3.2

Studie 8

Rau, F.C., Wigger, A., Tellhelm, B., Zwick, M., Klumpp, S., Neumann, A., Oltersdorf, B., **Amort, K.**, Failing, K., Kramer, M. (2011):

Observer variability and sensitivity of radiographic diagnosis of canine medial coronoid disease. Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere; 39(5): 313–322.

DOI: 10.1055/s-0038-1623595

Studie 9

Klumpp, S., Ondreka, N., **Amort, K.**, Zwick, M., Gesierich, K., Engert, M., Tacke, S., Failing, K., Kramer, M. (2010):

Diagnostic value of CT and MRI for the diagnosis of coronoid pathology in the dog.

Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere; 38(1): 7–14.

DOI: 10.1055/s-0038-1622827

Studie 10

Zweifel, R.T., DiDonato, P., Hartmann, A., Kramer, M., **von Pückler, K.H.** (2020):

Improved Computed Tomography Accuracy with a 1-mm versus 2- or 3-mm Slice Thickness for the Detection of Medial Coronoid Disease in Dogs.

Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology; 33(1): 45–50.

DOI: 10.1055/s-0039-3399524

Studie 11

Wennemuth, J., Tellhelm, B., Eley, N., **von Pückler, K.** (2020):

Computed Tomography Enhances Diagnostic Accuracy in Challenging Medial Coronoid Disease Cases: An Imaging Study in Dog Breeding Appeal Cases.

Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology; 33(5): 356–362.

DOI: 10.1055/s-0040-1714299

Studie 12

Holbein, L.M., **von Pückler, K.H.**, Kramer, M., Failing, K., Kirsch, M. (2020):

Computertomografische Morphologie des Ellbogengelenks und Vorkommen der Ellbogengelenkdysplasie beim Rotfuch (*Vulpes vulpes*).

Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/ Heimtiere; 48(3): 176–185.

DOI:10.1055/a-1162-1273

Observer variability and sensitivity of radiographic diagnosis of canine medial coronoid disease*

F. C. Rau¹; A. Wigger¹; B. Tellhelm¹; M. Zwick¹; S. Klumpp¹; A. Neumann¹; B. Oltersdorf¹; K. Amort¹; K. Failing²; M. Kramer¹

¹Department of Veterinary Clinical Sciences, Small Animal Clinic – Surgery, Justus-Liebig-University Giessen, Germany; ²Department of Veterinary Medicine, Unit of Biomathematics and Data Processing, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany

Key words

Fragmented medial coronoid process, intraobserver agreement, interobserver agreement, radiographic assessment and sensitivity, arthroscopy, computed tomography, dog

Summary

Objective: Medial coronoid disease (MCD) is a very common form of elbow joint disease and its radiographic diagnosis can be challenging since it is frequently based on the detection of rather subtle primary or secondary changes than on a large primary lesion. We hypothesized that accuracy of radiographic diagnosis of MCD is highly dependent on training and experience level. **Methods:** Radiographs of 102 canine elbows were evaluated for MCD by four observers with different levels of training and experience. All elbows underwent CT scans and arthroscopy. Sensitivity and specificity of radiographic and CT interpretation was determined using arthroscopy as a gold standard. Interobserver and intraobserver agreement (reliability and repeatability) were assessed by using Cohen's Kappa (κ) statistic. **Results:** The sensitivity (92.4–96.7%) of the two experienced observers was almost comparable to that of CT (100%) and significantly higher than that of the two less experienced observers (77.2–80.4%). Reliability of the radiographic diagnosis of MCD was better between observers with higher experience level ($\kappa = 0.74$) than between observers of lower or different experience levels ($\kappa = 0.07$ – 0.42). Repeatability was better in experienced ($\kappa = 0.73$ – 0.88) than in less experienced observers ($\kappa = 0.31$ – 0.42). **Conclusion:** Our results confirm that training and experience play important roles in reaching high sensitivity, reliability and repeatability for the radiographic diagnosis of MCD. **Clinical relevance:** Although radiography is inferior to CT in imaging of the medial coronoid process itself, sensitivity of radiographic diagnosis MCD can be significantly improved with observer experience almost reaching that of CT. Therefore, it is advised that radiographic screening for MCD should be performed by specialists experienced in the radiographic evaluation of elbow joint disease.

Schlüsselwörter

Koronoiderkrankung, radiologische Beurteilung, Interauswerterübereinstimmung, Intraauswerterübereinstimmung, Arthroskopie, Computertomographie, Hund

Zusammenfassung

Ziel: Die Koronoiderkrankung (MCD) ist eine sehr häufig auftretende Form der Ellbogengelenkerkrankung. Ihre Röntgendiagnose gestaltet sich häufig schwierig, da sie in vielen Fällen mehr auf der subjektiven Interpretation von geringen oder sekundären Veränderungen als auf der Detektion der primären Läsion selbst beruht. Ziel der Studie war, den Einfluss des Ausbildungs- und Erfahrungsgrades des Auswerters auf die Exaktheit der Röntgendiagnose MCD zu untersuchen. **Methoden:** Vier Auswerter mit verschiedenem Ausbildungs- und Erfahrungsgrad werteten Röntgenaufnahmen von 102 Hundeellbogen im Hinblick auf MCD aus. Für alle Ellbogen lagen die Ergebnisse der computertomographischen (CT) und arthroskopischen Untersuchung vor. Als Goldstandard zur Bestimmung der Sensitivität und Spezifität der Röntgen- und CT-Diagnose diente die Arthroskopiediagnose. Die Inter- und Intraauswerterkonkordanz der Röntgendiagnose MCD wurden mithilfe des Cohen's Kappa (κ) Statistiktest ermittelt. **Ergebnisse:** Die Sensitivität (92,4–96,7%) der beiden erfahrensten Auswerter war fast vergleichbar hoch mit der der CT (100%) und signifikant höher als die der weniger erfahrenen Auswerter (77,2–80,4%). Die Interauswerterkonkordanz (Verlässlichkeit) zwischen den beiden erfahreneren Auswertern ($\kappa = 0,74$) war besser als zwischen Auswertern mit weniger oder unterschiedlich großer Erfahrung ($\kappa = 0,07$ – $0,42$). Ebenso ergab sich zwischen erfahrenen Auswertern eine bessere Intraauswerterkonkordanz (Wiederholbarkeit) ($\kappa = 0,73$ – $0,88$) als zwischen weniger erfahrenen Auswertern ($\kappa = 0,31$ – $0,42$). **Schlussfolgerung:** Ausbildung und Erfahrung des Auswerters spielen eine entscheidende Rolle, um die Röntgendiagnose MCD mit hoher Sensitivität, hoher Verlässlichkeit und Wiederholbarkeit stellen zu können. **Klinische Relevanz:** Obwohl das Röntgen im Gegensatz zur CT keine überlagerungsfreie Darstellung des medialen Koronoids ermöglicht, kann durch eine entsprechende Auswertererfahrung die Sensitivität der Röntgendiagnose signifikant verbessert werden und fast die Sensitivität der CT-Diagnose erreichen. Folglich sollte bei Hunden das "Röntgenscreening" für MCD von Spezialisten durchgeführt werden.

Correspondence to

Dr. med. vet. Friederike C. Rau, Resident ECVDI
Department for Veterinary Clinical Sciences
Small Animal Clinic – Surgery
Justus-Liebig-University Giessen
Frankfurter Strasse 108
35392 Giessen, Germany
Email: friederike.c.rau@gmail.com

Auswerterabhängige Variabilität und Sensitivität der Röntgenverdachtsdiagnose Koronoiderkrankung

Tierärztl Prax 2011; 39 (K): 313–322

Received: April 19, 2011

Accepted after revision: September 14, 2011

* Dedicated to Prof. Dr. Ulrike Matis.

Introduction

Elbow dysplasia (ED) is one of the most common heritable diseases in dogs (17) and the most frequent cause of canine elbow osteoarthritis (13). The fragmented medial coronoid process (FCP) is the most common form of ED (11) causing forelimb lameness in juvenile dogs of large breeds, particularly Labrador retrievers and Rottweilers (10, 13, 24, 25). Thus, it is important that FCP is diagnosed as early as possible in order to allow appropriate therapy. The term medial coronoid process (MCD) has been introduced by some other authors (10, 25) to cover the entire spectrum of the medial coronoid process (MCP) lesions: fissuring and fragmentation of the medial coronoid process, and subchondral bone and/or cartilage pathology (10). Subchondral bone pathology often is clinically demonstrated by avascularity and softening of bone. Cartilage pathology of the MCP has been described as chondromalacia-like lesions (35, 36) or as “medial compartment erosions” (36) if the entire medial part of the elbow joint is severely affected, in absence of fragmentation or fissuring. Different diagnostic imaging techniques can be used to assess the medial coronoid process (MCP) of the ulna and establish a diagnosis of MCD such as radiography (5, 16, 25), computed tomography (CT) (28), magnetic resonance imaging (MRI) (31) and scintigraphy (34). However, an invasive method like arthroscopy is frequently required to confirm diagnosis (5, 7).

In spite of the fact that radiographic diagnosis of MCD is difficult and radiography is inferior to advanced imaging modalities such as CT and MRI in imaging the MCP (4, 31) radiography still remains the primary imaging modality in general practice because it is widely available, requires no or short sedation of the patient and is inexpensive. Screening for elbow dysplasia (ED) according to the International Elbow Working Group (IEWG) guidelines (32) is routinely performed by evaluating radiographs for ED lesions and osteoarthritis.

A distinct disadvantage in the radiographic diagnosis of MCD remains the inability to define the cranioproximal and medial border of the MCP without superimposition of other bony structures on any radiographic projection (15), which leads to a low detection rate of free fragments usually seen in subsequent CT or arthroscopic exams (4, 10, 14, 25, 39). Thus, presumptive radiographic diagnosis MCD is frequently based on the detection of secondary arthrotic changes like periarticular osteophytosis, rather than the detection of primary lesions. Osteophyte assessment proves to be only sensitive as an indicator of late signs of osteoarthritis (1, 19). However, more recent studies show that the inclusion of other radiographic changes such as loss of definition of the MCP outline on the mediolateral radiographs of elbow joints (16) as well as an increased trochlear notch sclerosis (TNS) (3, 9, 16, 30) significantly increases the sensitivity (3, 9, 20) above previously reported sensitivities (4, 19, 28) of radiographic detection of MCD.

In our opinion, detection and interpretation of radiographic signs of MCD, and thus sensitivity of the presumptive radiographic diagnosis, is highly dependent on the training and experi-

ence level of the observer. The aim of our study was to investigate the sensitivity of observers with different experience levels in the radiographic detection of MCD compared to CT, using arthroscopy as a gold standard. Further, we were interested in evaluating inter- and intraobserver agreement.

Our hypotheses were:

- 1) Sensitivity of the radiographic diagnosis of MCD would increase with the experience level of the observer.
- 2) Agreement between radiographic and CT diagnosis of MCD would increase with the experience level of the observer.
- 3) Interobserver agreement of observers of higher experience levels would be better than that of observers with less experience.
- 4) Intraobserver agreement would be better in experienced than less experienced observers.
- 5) Intraobserver agreement would be better than interobserver agreement in experienced observers.

Material and methods

Study population

In this retrospective study, the clinical database of the Clinic for Small Animals of the University Giessen, Germany, was searched for dogs that had undergone radiographic evaluation, CT and arthroscopy of their elbow joint from January 2007 to December 2008. Inclusion criteria were thoracic limb lameness localized to the elbow joint, diagnostic quality radiographs, CT scans and arthroscopy. Cases treated for any prior elbow pathology were excluded.

Radiographic, computed tomographic and arthroscopic assessment of MCD

The radiographic projections evaluated were extended cranio 15° lateral-caudomedial oblique (Cr15L-CdMO) and two mediolateral radiographs, one with elbow in 135° flexion (extended ML view) and one with 90° flexion (flexed ML view). Radiographs were obtained with a vertical beam and same focus-film and object-film distance.

Sensitivity, specificity and inter- and intraobserver agreement of the radiographic detection of MCD were determined by four observers of different experience levels (one last-year student, one first-year doctoral student in small animal surgery, one 4th year ECVDI resident and one ECVDI diplomate with extensive experience in scrutinizing ED). The radiographs of 102 elbows were independently assessed for MCD and osteophyte formation to determine interobserver agreement. For intraobserver agreement a subset of the radiographs (60 of 102 elbows) were assessed by all four observers on two separate occasions at least 2 weeks apart. All observers assessed suspicion or absence of MCD or definitive presence of MCD which was determined by fragmentation or fissuring (► Table 1). According to the current IEWG guidelines (32) suspi-

Table 1

Assessment of radiographic, computed tomographic and arthroscopic findings in medial coronoid disease (MCD) and osteoarthritis (MCP, medial coronoid process).

Assessment	Grade	Definition
Radiographic MCD grade	0	normal MCP
	1	suspicion of MCD*
	2	definitive MCD (fragment/fissure visible)
Radiographic osteophyte grade	0	no osteophytes
	1	mild contour changes; "borderline"
	2	maximal osteophyte height < 2 mm
	3	maximal osteophyte height 2–5 mm
	4	maximal osteophyte height > 5 mm
Computed tomographic MCD grade	0	normal MCP
	1	suspicion of MCD**
	2	definitive MCD (fragment/fissure visible)
Arthroscopic MCD grade	0	normal MCP
	1	MCD (fragment, fissure, other MCP pathology)
* Changes in shape, outline, radiopacity of the MCP, increased trochlear notch sclerosis, elbow joint incongruity		
** Changes in shape, density of MCP, increased trochlear notch sclerosis, irregular radial incisure, elbow joint congruity		

cion of MCD was raised if changes in shape, outline, radiopacity of the MCP and/or arthrotic changes at the elbow joint (anconeal process, radial head, medial or lateral humeral epicondyle), and/or increased TNS and humeroradial incongruity were present.

For CT scanning (Brilliance CT, Phillips, Hamburg, Germany) patients were sedated according to a previously reported anaesthesia protocol (38) and positioned in dorsal recumbency with both forelimbs in extension avoiding any pronation or supination of the limbs. Scan parameters were helical modality, 0.28 s/rotation, 200 mAs, 140 kV, 1 mm slice thickness. Unaware of arthroscopic findings, one single observer reviewed the CT images using a bone window with a window width of 2200–2500 Hounsfield Units (HU) and window level of 400–600 HU. CT data were reviewed as transverse slices and by using multiplanar reconstructions in dorsal, sagittal and oblique planes. Grading was performed according to ► Table 1. Suspicion of MCD was raised if changes of shape and/or density of MCP and/or arthrotic changes at any site of the elbow joint and/or TNS were present. An additional irregular radial incisure of the ulna supported the suspicion of MCD.

Arthroscopies were performed by experienced surgeons and documented by video clips and still images. Videos or still images and reports were reviewed by one single experienced orthopaedic surgeon for normal and diseased MCP. MCD was diagnosed if fragments or fissure lines were detected or if the MCP showed any other pathologic changes like avascularity and softening of the subchondral bone or cartilage damage of the MCP (► Table 1). Elbows without overt cartilage fissuring or fragmentation, proofed by probing the MCP but with cartilage and/or subchondral pathology of the MCP were categorized as MCD positive elbows.

Statistical analysis

Data were analyzed by two-way and multiway frequency tables. Sensitivity was defined as the proportion of elbows that were positive for MCD based on arthroscopy and correctly diagnosed as MCD suspicious or MCD positive with radiography and CT, respectively.

Specificity was defined as the proportion of elbows, that were negative for MCD in arthroscopy and correctly diagnosed as MCD negative with radiography or CT. Specificity and sensitivity were calculated for each observer. Two by two tables were used for sensitivity and specificity calculations. Additionally, 95% confidence intervals were determined for both values.

Inter- and intraobserver agreement was assessed by using Cohen's Kappa (κ) statistic. Interpretation (18) of the Cohen's Kappa (κ) value was performed as shown in ► Table 2. Statistical analyses were performed with help of a statistical software program (BMDP/Dynamic Statistical Software Release 8.2 BMDP4F) developed for two-way or multiway frequency tables (8).

Results

Study population

A total of 102 (51 left and 51 right) elbows of 65 dogs met all inclusion criteria. The median age of the dogs was 14 months (range: 5–122 months) and the median weight was 32 kg (range 19–56 kg).

Table 2 Interpretation of Cohen's Kappa statistic (κ) for strength of agreement.

Cohen's Kappa statistic (κ)	Strength of agreement
< 0.00	Poor
0.00–0.20	Slight
0.20–0.40	Fair
0.41–0.60	Moderate
0.61–0.80	Substantial
0.81–1.00	Almost perfect

Forty-five dogs were male (69.2%) and 20 were female (30.8%). Labrador Retrievers (29.2%) were the most commonly represented among 17 breeds followed by Golden Retrievers (13.8%) and Rottweilers (12.3%). Fifty-one of 65 (78.5%) dogs were bilaterally and 14 of 65 (21.5%) were unilaterally affected with MCD.

Radiographic, computed tomographic and arthroscopic findings for MCD

Out of the 102 elbows 92 (90.2%) were positive for MCD and 10 (9.8%) were free of any abnormalities affecting the MCP in arthroscopy. The majority of the elbows (78.4%) in our study showed displaced (20.6%) and non-displaced (18.6%) fragments and fissures (39.2%). Only 13 (12.7%) elbows showed subchondral bone and cartilage pathology of the MCP tip exclusively, without any overt fragmentation or fissuring (► Table 3).

Depending on the degree of radiological experience of the observer the number of MCD positive elbows on radiographs varied between 79 to 95. Based on CT, 100 out of 102 elbows were rated as MCD positive (► Table 3).

MCP	Student	Doctoral Student	Resident	Diplomate	CT	Arthros
Total MCD-positive	79	83	91	95	100	92
Fragmented or fissured MCP	23	17	17	12	61	79
Suspicion of MCD	56	66	74	83	39	13
MCD-negative	23	19	11	7	2	10

Assessment MCD	Student	Doctoral student	Resident	Diplomate	CT
Sensitivity (%) CI ₉₅	77.2 (0.67–0.85)	80.4 (0.71–0.88)	92.4 (0.85–0.97)	96.7 (0.91–0.99)	100 (0.97–1.0)
Specificity (%) CI ₉₅	20.0 (0.03–0.55)	10.0 (0.00–0.45)	40.0 (0.12–0.74)	40.0 (0.12–0.74)	30.0 (0.07–0.65)

The detection rate for fragmentation and fissuring ranged from 12–23 of 102 elbows in radiography, whereas the detection was higher in CT (61 of 102) and arthroscopy (79 of 102). However, the number of elbows that were considered as suspicious for MCD (56–83 of 102) was higher with radiography than with CT (39 of 102) and with arthroscopy (13 of 102) (► Table 3).

Radiographically, no osteophyte formation was detected in 14–31 (14.4–30.4%) of the elbows and 11–30 (10.7–19.6%) of the elbows were scored due to minimal contour changes predominantly occurring on the dorsal aspect of the anconeal process as “borderline”, depending on the individual observer. CT detected periarticular osteophytosis exceeding minimal contour changes on any aspect of the elbow joint, classified as “borderline” changes, in 82.5% of the cases.

Sensitivity and specificity

Sensitivity of the radiographic assessment for MCD using arthroscopy as gold standard increased with higher level of experience up to 96.7% for the most experienced observer (► Table 4). The second most experienced observer (ECVDFI resident) had a sensitivity of 92.4% and the second least experienced observer (doctoral student) showed a sensitivity of 80.4%. The least experienced observer (student) showed the lowest sensitivity of 77.2%. Assessment of MCD by reviewing CT scans had a sensitivity of 100%.

Correspondingly, we found the highest specificity of 40% for the two most experienced observers, followed by the least experienced observer with a specificity of 20%. The second least experienced observer reached a specificity of 10% by rating 9 of 10 elbows false positive. Specificity of CT assessment was 30% with 7 out of 10 false positives.

The sensitivity and specificity of CT for detection of fragments was 70% and 60.9%. Radiographic detection of fragments showed significantly lower sensitivity (28.2–38.5%) than CT, independent of the level of experience (► Table 5).

Table 3 Results of the radiographic assessment of the different observers, computed tomographic (CT) and arthroscopic assessment (Arthros) of the medial coronoid process (MCP) for medial coronoid disease (MCD) in absolute numbers (n).**Table 4** Sensitivity and specificity of radiographic assessment of each observer and computed tomographic assessment for the diagnosis of medial coronoid disease (MCD) using arthroscopic findings as gold standard; confidence interval to 95th percentile (CI₉₅) in brackets.

Table 5

Sensitivity and specificity of radiographic assessment of each observer and computed tomographic assessment for the detection of fragments using arthroscopic findings as gold standard; confidence interval to 95th percentile (CI_{95}) in brackets.

Assessment fragments	Student	Doctoral student	Resident	Diplomate	CT
Sensitivity (%) CI_{95}	30.8 (0.17–0.48)	30.8 (0.17–0.47)	38.5 (0.23–0.55)	28.2 (0.15–0.45)	70.0 (0.53–0.83)
Specificity (%) CI_{95}	82.5 (0.71–0.91)	92.1 (0.82–0.97)	96.8 (0.89–0.99)	98.4 (0.91–0.99)	60.9 (0.54–0.65)

However, if fragments were detected by the observers, they were detected with a high specificity (82.5–98.4%).

Inter- and intraobserver agreement of radiographic assessment

Interobserver agreement for the radiographic assessment using two categories (presence or absence of MCD) showed the best results with a “substantial” agreement of $\kappa = 0.74$ between the two most experienced observers, while the interobserver agreement among all other observers was only “slight to moderate” ($\kappa = 0.07$ – 0.42) (► Fig. 1). Interestingly, the “moderate” ($\kappa = 0.42$) agreement was seen between the two least experienced observers. When the interobserver agreement was compared using three categories (presence, absence or suspicion of MCD), the kappa values (κ) decreased mildly but not significantly for all observers.

The intraobserver agreement was determined to assess the repeatability and consistency of the individual observer in the radio-

graphic interpretation. The two most experienced observers showed “substantial to almost perfect” intraobserver agreement ($\kappa = 0.73$ – 0.88), while that of the two less experienced observers was “fair to moderate” ($\kappa = 0.31$ – 0.42) (► Fig. 2). When the intraobserver agreement was compared using the three categories (presence, absence or suspicion of MCD), the kappa values (κ) decreased slightly but not significantly for all observers.

Discussion and conclusion

The purpose of this study was to evaluate the impact of observer experience on the sensitivity, reliability (interobserver agreement) and repeatability (intraobserver agreement) of radiographic diagnosis of MCD. Sensitivity significantly increased with experience and came close to the sensitivity of CT. Reliability was better between observers with high experience than between observers of lower or different experience level. Repeatability positively correlated with the experience level as well. Intraobserver agreement

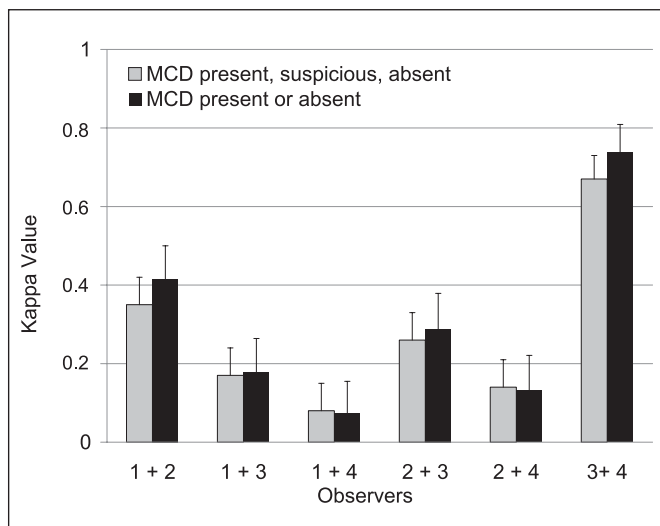


Fig. 1 Interobserver agreement for the radiographic diagnosis of medial coronoid disease (MCD). Interobserver agreement was best between the two most experienced observers with substantial agreement, while it was only slight to moderate between the other observers. No significant differences were observed regardless of the use of two categories (MCD present or absent) or three categories (MCD present, suspicious, absent). Observers: 1: student; 2: doctoral student; 3: resident and 4: diplomate. Error bars represent asymptotic standard error.

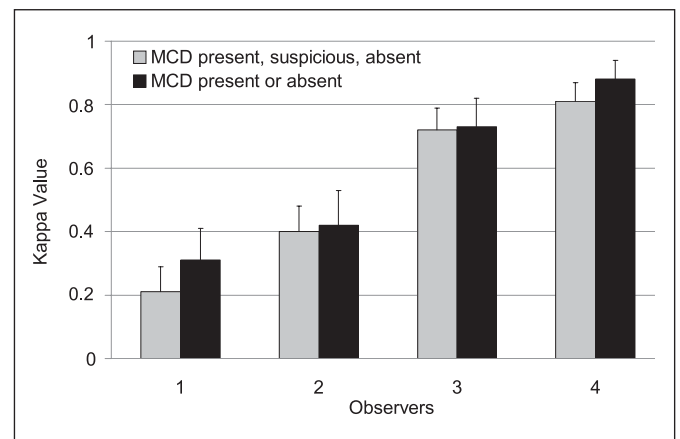


Fig. 2 Intraobserver agreement for the radiographic assessment of the diagnosis medial coronoid disease (MCD). A high kappa value in the intraobserver agreement was positively associated with increasing experience. The two most experienced observers showed “substantial to almost perfect” intraobserver agreement, while that of the two less experienced observers was “fair to moderate”. When the intraobserver agreement was compared by using three categories (MCD present, suspicious, absent) the most severe decrease in agreement was seen in the least experienced observer by one category from “slight” to “poor” agreement. Observers: 1: student; 2: doctoral student; 3: resident and 4: diplomate. Error bars represent asymptotic standard error.



Fig. 3

Spectrum of radiographic findings of medial coronoid disease (MCD). a) Normal elbow joint without signs of MCD: Well-delineated, triangular-shaped MCP (star) of normal radiopacity, normal trochlear notch sclerosis (TNS) with trabecular pattern (arrow), no joint incongruity and no secondary arthrotic changes on any aspect (arrowheads) of the elbow joint. b) Definitive MCD: Fragmentation of the MCP: Fragment (white arrow) is visible on the craniocaudal view. On mediolateral view: Defects (wide arrow heads) on the MCP (star), moderately increased TNS (arrow) and severe arthrosis on all aspects of the elbow joint (small arrowheads). c) and d): Suspicion of MCD: Decreased radiopacity and abnormal shape of the MCP (star), mildly increased TNS (arrow), as well as mild arthrosis and minimal contour changes at the radial head or on the dorsal aspect of the anconeal process, respectively. Additionally, mild radioulnar step formation is visible on c). MCP = medial coronoid process of the ulna.

was better than interobserver agreement in the case of the most experienced observer.

The median age and weight of the dogs in our study group was similar to other studies (9, 22, 25, 39). Also consistent with others studies (10, 12, 22, 25, 39) male dogs were more commonly affected by MCD than females (ratio 2.3 to 1) and the majority of dogs (78.5%) were bilaterally affected (9, 10, 26, 39). The overrepresentation of Labrador Retrievers, Golden Retrievers and Rottweilers is consistent with many other studies (9, 12, 22, 25).

Arthroscopic findings including fissuring and fragmentation (77.5%) of the MCP were in mildly or moderately higher frequency present than in other studies (10, 25, 35). Subchondral and cartilage pathology without overt fragmentation or fissuring was identified in 12.7% of the cases compared with “chondromalacia-like lesions” and grossly intact MCP with cartilage damage previously reported in 18.2% and 17.6%, respectively (35, 10). The MCP was intact in 9.8% of the cases and was lower compared with the reported 15% in a recent study (25).

In 38.2% of the cases CT raised a suspicion for MCD without detecting signs of fragmentation or fissuring of MCP, which was comparable with the reported incidence of 30% of elbows showing only MCP sclerosis or lucency without fragmentation or fissuring (25). Consistent with the low reported incidence of 1% of elbows showing no pathological changes on CT in that study (25), only 2% of the evaluated elbows in our study showed no abnormalities on CT. Osteophyte formation was detected by CT in 82.5% of the cases. This was comparable with 84% found in the above mentioned study (25).

It has been confirmed that preoperative radiographs are clinically helpful for ruling elbow disease in or out (5), however, simi-

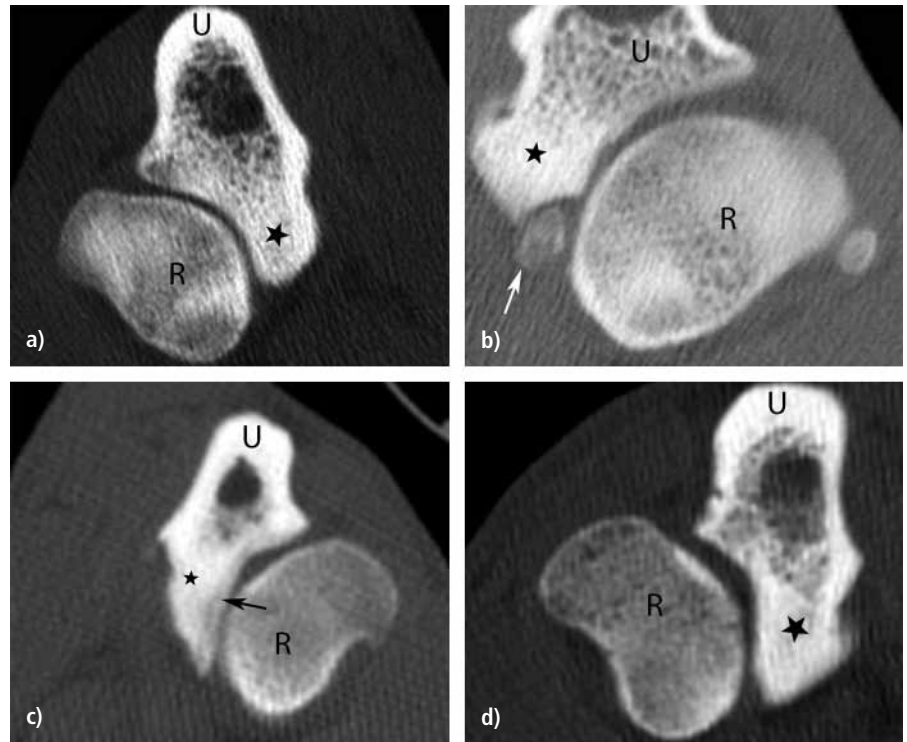
lar to other studies (10, 15, 26), fragmentation of the MCP was often not visible on radiographs. In 54.0–81.4% of the elbows the observers could only raise suspicion of MCD due to the lack of visibility of the primary lesion on x-rays, whereas the primary lesion could be visualized in nearly 60% of CT scans. While the sensitivity of radiographic detection of fragments in all observers was low (< 40%), the specificity (82.5–98.4%) was higher than that of CT (60.9%). The high specificity of the most experienced observer (98.4%) indicates that if fragments are detected on radiographs, they can be confirmed in arthroscopy with a high probability in contrast to CT, suggesting overinterpretation of fissure lines or misinterpretation of incompletely mineralized osteophytes associated with the joint capsule as MCP fragments by CT (4, 25).

The sensitivity of radiographic detection of fragments in our study was at 28.2–38.5%, which is more than double than 12.6% reported in a recent study (10). This is most likely due to the fact that we used the Cr15L-CdMO projection instead of the straight craniocaudal projection. The Cr15L-CdMO projection improves the visibility of the MCP by isolating it from other bony structures (15, 39) and most reliably allows for identification of secondary degenerative changes, similar to craniocaudal and mediolateral extended projection (39). Consequently, we used mediolateral extended and flexed as well as Cr15L-CdMO radiographic projections as recommended by the IEWG guidelines for screening ED.

More importantly, the overall sensitivity of radiography to detect pathologic changes of the MCP including fragmentation, fissuring and other subchondral bone and cartilage pathologies reached sensitivities between 77.2–96.7% and increased with the level of training and experience. This is in contrast to previous

Fig. 4

Spectrum of CT findings of medial coronoid disease (MCD). a) Normal elbow joint without signs of MCD: MCP (star) of normal shape and radiopacity with trabecular pattern, no joint incongruity and no secondary arthrotic changes. b) Definitive MCD: Fragmentation of the MCP: Displaced, rounded and radiolucent fragment (white arrow) at the tip of the sclerotic MCP (star), moderate arthrotic changes at the ulna, and mild radioulnar joint incongruity. c) Definitive MCD: Fissure formation (arrow) parallel to the radioulnar incisure, extending from the tip of the base of the sclerotic abnormally shaped MCP, mild arthrotic changes and moderate radioulnar joint incongruity. d) Suspicion of MCD: Sclerosis and mildly abnormal shape of the tip of the MCP (star) and moderate radioulnar joint incongruity. MCP = medial coronoid process of the ulna; R = radius; U = ulna.



studies reporting significantly lower sensitivities ranging between 10–62% (4, 15, 39). However, more recent studies reported high sensitivities for the radiographic detection of arthritis secondary to MCD ranging between 51–89% and 77–96% (3, 9). In those studies, like in our study, the radiographic assessment included besides fragmentation of the MCP and periarticular osteophytosis more subtle changes like TNS. Thus, the sensitivity of detecting MCD was increased, particularly when combined with the other radiographic signs (9).

The absence of osteophytosis in up to 30% of MCD affected dogs in our study and reported by others (10) suggests that screening tests based only on periarticular osteophytosis may fail to identify some dogs with MCD. Moreover, a lack of periarticular osteophytes at 2 years of age does not rule out the presence of MCD (24, 27) as previously suggested (37). In a very recent study (36), 19.6% of dogs older than 6 years diagnosed with MCD lacked osteoarthritis. In fact, we found that elbows without arthrotic changes or minimal contour changes graded as “borderline” according to the scheme of the IEWG were significantly overrepresented in the group of false negatives.

This confirms that inclusion of radiographic changes other than osteoarthritis is essential to reach high sensitivity. Such radiographic changes include indistinct cranial contour of MCP, heterogeneous radiopacity of MCP, increased TNS, and radioulnar incongruity caused by a short radius or short ulna. Of these radiological changes, the evaluation of incongruity has poor sensitivity and specificity (5, 21, 29), is highly dependent on the positioning of the elbow and evaluation is very subjective (29). Assessment of the shape, outline and radiopacity of the MCP is also subjective (3, 5,

6) and thus is highly dependent on experience of the observer with ED screening.

A recent study (9) showed that inclusion of TNS increased the overall sensitivity of diagnosing osteoarthritis secondary to MCD (77–96%) above other radiographic tests (43–74%) such as radiographic osteophyte or MCP assessment. More importantly, inclusion of TNS increased the sensitivity of diagnosing diseased elbows without secondary osteophytes. The degree of sclerosis correlated to the grade of MCD. Furthermore, in Belgian Shepherd dogs blurring of the cranial edge of the MCP and TNS were reported as reliable signs of elbow dysplasia with a sensitivity and specificity of 80% and 90% (20). Although we were aware, that TNS is an early and important radiographic sign to raise suspicion of MCD, we did not attempt to assess TNS as a singular criterion. We decided to assess TNS in line with the assessment of secondary arthrotic changes, because we regard TNS as an early marker for secondary degenerative changes.

Like most radiographic changes, TNS often relies on subjective interpretation by the observers rather than on objective measurements. Interobserver agreement for the visual assessment of TNS (3) was found to be only “fair” and was best between diagnostic imaging diplomats only. Intraobserver assessment was “moderate to substantial” in that study. In another previous study (9) interobserver agreement for TNS descriptive assessment were “moderate to substantial” between the two more experienced observers and only “slight” between the least experienced observer and the other observers.

In our study we found a better inter- and intraobserver agreement for the diagnosis of MCD between experienced observers.

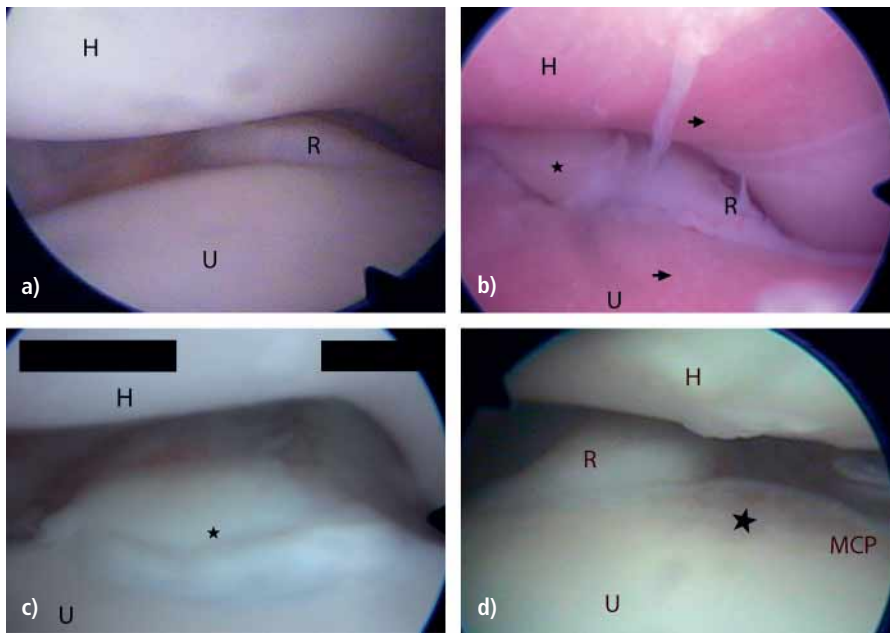


Fig. 5

Spectrum of arthroscopic findings of medial coronoid disease (MCD). a) Normal elbow joint: Smooth, regular and normally colored cartilage surface. b) MCD: Displaced fragment (star) and outerbridge grade 5 erosions are visible as racing stripes on the medial humeral condyle (arrow) and MCP (arrow). c) MCD: Non-displaced fragment (star). d) MCD: Avital soft bone and chondromalazia-like lesions: Irregular, soft and discolored cartilage (star) without a fissure or fragment of the MCP. Softening of the subchondral bone of the tip of the MCP was detected by probing. MCP = medial coronoid process of the ulna; R = radius; U = ulna; H = humerus.

We speculate that experience helps to detect subtle pathological radiographic changes, to distinguish between “normal” and “abnormal” and to avoid under- or overinterpretation of the changes. Furthermore, it leads to a greater certainty and repeatability of the diagnosis as it is confirmed by the “substantial to almost perfect” intraobserver agreement of the experienced observers. “Slight to poor” intraobserver agreement of the least experienced observers supports this assumption. Reliability of the diagnosis among the observers tested by interobserver agreement was “substantial” if observers had experience in ED scoring. This may be favoured by the training of the resident by the diplomate over several years.

It is still a subject of debate if objectifying subtle radiological changes like TNS by measurement would improve accuracy, reliability and repeatability of the radiological diagnosis of MCD, especially in less experienced observers. A system to determine the radiopacity of TNS using digital analysis has been published (2). Increase in radiopacity throughout the ulnar trochlear notch region measured by quantitative digital analysis was a radiological finding associated with MCD in Labrador Retrievers. Since we used the same print-outs for each observer to avoid bias, digital analysis of the degree of sclerosis was not possible.

A TNS ratio that is easy to apply in general practice in contrast to x-ray absorptiometry was described in another study (9). However, the authors (9) still recommend using a combination of descriptive and ratio assessment, because the extent of sclerosis (ratio) may not increase to a degree that can be measured, whereas there may be an increase of subjective detectable radiopacity.

To improve the interpretation of more subtle radiographic signs of MCD, in our experience it is very valuable to compare radiographic, CT and arthroscopic findings in cases that are evaluated as MCD free in the radiographic assessment, but turn out to be MCD affected on CT or arthroscopy.

With all of these attempts to increase sensitivity of the radiographic assessment of MCD, it is important to keep in mind that elbows radiographically considered as “normal”, whether subjectively or objectively, can still clinically be affected by MCD (27). In our clinic the contralateral elbow is imaged regardless of whether the dog is clinically affected only unilaterally in order to prevent diseased but clinically “silent” elbows from being missed. However, even if CT shows no abnormalities, a MCP may histologically be considered as “abnormal” (33).

This was a retrospective study and therefore has its limitations.

The population was not randomly selected and these cases do not represent all cases presented with elbow disease at our clinic during the study period, because inclusion criteria asked for elbows of dogs that had undergone CT and arthroscopy. We used arthroscopy as gold standard in our study because it allows the direct observation of MCD and there is no definitive “gold standard test” for the diagnosis of MCD. Certainly histopathology would have been optimal as a gold standard test since it has been proven (7) that fissuring in subchondral bone occurs before fibrillation of articular cartilage develops. Collection of tissue at the time of arthroscopy for histopathology would have been ideal, but was unacceptable due to the associated morbidity. It is still subject of debate whether arthroscopy or CT can serve by itself as a gold standard test. A recent comparison (25) of CT with arthroscopy for the assessment of MCD showed that these procedures were complementary for MCD assessment.

The definition of MCD in this study and thus the classification of elbows with cartilage pathology in absence of fragmentation and fissuring as MCD positives may be considered controversial, but has been reported by other authors before (7, 10, 25, 36). It is debatable, if those elbows are more accurately classified as medial

Clinical relevance

Radiography is still the primary imaging modality for MCD screening because of its low costs, wide availability and rare need for anaesthesia. However, radiographic diagnosis of MCD is reported to be inferior to advanced diagnostic imaging techniques such as CT and MRI offering superimposition free inspection of the MCP. In contrast to CT, radiographic diagnosis of MCD is based on mainly subjective interpretation of rather subtle primary and secondary changes than that of a large primary lesion. Thus, radiographic diagnosis of MCD is challenging and depends highly on training and experience. When read by specialists, radiographic diagnosis of MCD can reach very high sensitivity, almost comparable to CT, with high reliability and high repeatability. While most of the breeding associations require radiographic ED evaluation by specialists, there is no recommendation existing for the growing individual canine patient. Therefore, radiographic screening for MCD in the individual patient is advised to be performed or at least proof-read by trained specialists to increase chance of early detection and therapy.

compartment disease. We are convinced that such cases should be included within the diagnosis of MCD since it is reported that excised coronoid specimens of elbows with comparable changes were permeated by subchondral microcracks and diffuse microdamage in the histomorphometrical examination (10).

Our study population was biased due to the lack of availability of arthroscopies of dogs without MCD. Nevertheless, we determined the specificity of radiographic and CT diagnosis of MCD although we were aware that the low numbers of "MCD-free" elbows in arthroscopy were limiting to the interpretation of specificity. Consequently, our study has a lack of ability to obtain estimates for accuracy and predictive values for radiographic diagnosis of MCD of the single observers.

In the authors' and others' opinion (9), sensitivity is more important than specificity in detecting MCD. While false positive results may occur in practice due to inexperience, it is preferable to over diagnose and pursue a further diagnostic step in order to start therapy in a timely manner than to wait for the occurrence of radiographic signs of osteoarthritis.

Investigator factors may represent a further study limitation. Arthroscopic and CT assessments were performed by a single observer and not by a consensus diagnosis of several observers. This could be a source of inaccuracy and bias since interpretation of arthroscopic and CT findings were at least partly subjective. Further, the different levels of radiographic interpretation experience were represented by only a single observer instead of groups of several observers.

In summary, the results of this study confirm our hypotheses that training and experience are essential to reach high sensitivity, reliability, and repeatability because radiographic diagnosis of MCD is based on mainly subjective interpretation of different assessment criteria. Therefore, radiographic screening for MCD is

advised to be performed by specialists experienced in ED screening to ensure optimal outcome.

Conflict of interest

The authors confirm that they do not have any conflict of interest.

References

- Berry CR. Evaluation of the canine elbow for fragmented medial coronoid process. *Vet Radiol Ultrasound* 1992; 33: 273–276.
- Burton NJ, Comerford EJ, Bailey M, Pead MJ, Owen MR. Digital analysis of ulnar trochlear notch sclerosis in Labrador retrievers. *J Small Anim Pract* 2007; 48: 220–224.
- Burton NJ, Toscano MJ, Barr FJ, Owen MR. Reliability of radiological assessment of ulnar trochlear notch sclerosis in dysplastic canine elbows. *J Small Anim Pract* 2008; 49: 572–576.
- Carpenter LG, Schwarz PD, Lowry JE, Park RD, Steyn PF. Comparison of radiologic imaging techniques for diagnosis of fragmented medial coronoid process of the cubital joint in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1993; 203: 78–83.
- Cook CR, Cook JL. Diagnostic imaging of canine elbow dysplasia: A review. *Vet Surg* 2009; 38: 144–153.
- Cook JL, Cook CR. Bilateral shoulder and elbow arthroscopy in dogs with forelimb lameness: Diagnostic findings and treatment outcomes. *Vet Surg* 2009; 38: 224–232.
- Danielson KC, Fitzpatrick N, Muir P, Manley PA. Histomorphometry of fragmented medial coronoid process in dogs: A comparison of affected and normal coronoid processes. *Vet Surg* 2006; 35: 501–509.
- Dixon WJ (chief editor). *BMDP Statistical Software Manual, Volume 1 and 2*. Berkeley, Los Angeles, London: University of California Press 1993.
- Draffan D, Carrera I, Carmichael S, Heller J, Hammond G. Radiographic analysis of trochlear notch sclerosis in the diagnosis of osteoarthritis secondary to medial coronoid disease. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2009; 22: 7–15.
- Fitzpatrick N, Smith TJ, Evans RB, Yeadon R. Radiographic and arthroscopic findings in the elbow joints of 263 dogs with medial coronoid disease. *Vet Surg* 2009; 38: 213–223.
- Flückiger M. Elbow dysplasia (ED) in the dog. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1992; 134: 261–271.
- Gemmill TJ, Clements DN. Fragmented coronoid process in the dog: is there a role for incongruity? *J Small Anim Pract* 2007; 48: 361–368.
- Grøndalen J. Arthritis in the elbow joint of young rapidly growing dogs. 6. Interrelation between clinical, radiographical and pathoanatomical findings. *Nord Vet Med* 1982; 34: 65–75.
- Groth AM, Benigni L, Moores AP, Lamb CR. Spectrum of computed tomographic findings in 58 canine elbows with fragmentation of the medial coronoid process. *J Small Anim Pract* 2009; 50: 15–22.
- Haudiquet PR, Marcellin-Little DJ, Stebbins ME. Use of the distomedial-proximolateral oblique radiographic view of the elbow joint for examination of the medial coronoid process in dogs. *Am J Vet Res* 2002; 63: 1000–1005.
- Hornof WJ, Wind AP, Wallack ST, Schulz KS. Canine elbow dysplasia – The early radiographic detection of fragmentation of the coronoid process. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2000; 30: 257–267.
- Janutta V, Hamann H, Klein S, Tellhelm B, Distl O. Genetic analysis of three different classification protocols for the evaluation of elbow dysplasia in German shepherd dogs. *J Small Anim Pract* 2006; 47: 75–82.
- Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; 33: 159–174.
- Lang J, Busato A, Baumgartner D, Flückiger M, Weber UT. Comparison of two classification protocols in the evaluation of elbow dysplasia in the dog. *J Small Anim Pract* 1998; 39: 169–174.
- Lappalainen AK, Molsa S, Liman A, Laitinen-Vapaavuori O, Snellman M. Radiographic and computed tomography findings in Belgian shepherd dogs with mild elbow dysplasia. *Vet Radiol Ultrasound* 2009; 50: 364–369.

21. Mason DR, Schulz KS, Samii VF, et al. Sensitivity of radiographic evaluation of radio-ulnar incongruence in the dog in vitro. *Vet Surg* 2002; 31: 125–132.
22. Meyer-Lindenberg A, Fehr M, Nolte I. Co-existence of ununited anconeal process and fragmented medial coronoid process of the ulna in the dog. *J Small Anim Pract* 2006; 47: 61–65.
23. Meyer-Lindenberg A, Langhann A, Fehr M, Nolte I. Arthrotomy versus arthroscopy in the treatment of the fragmented medial coronoid process of the ulna (FCP) in 421 dogs. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2003; 16: 204–210.
24. Meyer-Lindenberg A, Langhann A, Fehr M, Nolte I. Prevalence of fragmented medial coronoid process of the ulna in lame adult dogs. *Vet Rec* 2002; 151: 230–234.
25. Moores AP, Benigni L, Lamb CR. Computed tomography versus arthroscopy for detection of canine elbow dysplasia lesions. *Vet Surg* 2008; 37: 390–398.
26. Olsson SE. The early diagnosis of fragmented coronoid process and osteochondritis dissecans of the canine elbow joint. *J Am Anim Hosp Assoc* 1983; 19: 616–626.
27. Punke JP, Hulse DA, Kerwin SC, Peycke LE, Budsberg SC. Arthroscopic documentation of elbow cartilage pathology in dogs with clinical lameness without changes on standard radiographic projections. *Vet Surg* 2009; 38: 209–212.
28. Reichle JK, Park RD, Bahr AM. Computed tomographic findings of dogs with cubital joint lameness. *Vet Radiol Ultrasound* 2000; 41: 125–130.
29. Samoy Y, Van Ryssen B, Gielen I, Walschot N, van Bree H. Review of the literature: elbow incongruity in the dog. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2006; 19: 1–8.
30. Smith TJ, Fitzpatrick N, Evans RB, Pead MJ. Measurement of ulnar subtrochlear sclerosis using a percentage scale in Labrador Retrievers with minimal radiographic signs of periarticular osteophytosis. *Vet Surg* 2009; 38: 199–208.
31. Snaps FR, Balligand MH, Saunders JH, Park RD, Dondelinger RF. Comparison of radiography, magnetic resonance imaging, and surgical findings in dogs with elbow dysplasia. *Am J Vet Res* 1997; 58: 1367–1370.
32. Tellhelm B. The IEWG screening protocol for elbow dysplasia. Proceedings of the 25th Annual Meeting of the International Elbow Working Group, Bologna, Italy, 2010.
33. Tromblee TC, Jones JC, Bahr AM, Shires PK, Aref S. Effect of computed tomography display window and image plane on diagnostic certainty for characteristics of dysplastic elbow joints in dogs. *Am J Vet Res* 2007; 68: 858–871.
34. van Bruggen LW, Hazewinkel HA, Wolschrijn CF, Voorhout G, Pollak YW, Barthez PY. Bone scintigraphy for the diagnosis of an abnormal medial coronoid process in dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 2010; 51: 344–348.
35. VanRyssen B, vanBree H. Arthroscopic findings in 100 dogs with elbow lameness. *Vet Rec* 1997; 140: 360–362.
36. Vermote KA, Bergenhuyzen AL, Gielen I, van Bree H, Duchateau L, Van Ryssen B. Elbow lameness in dogs of six years and older: arthroscopic and imaging findings of medial coronoid disease in 51 dogs. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2010; 23: 43–50.
37. Walde I, Tellhelm B. Fragmented medial coronoid process of the ulna (FCP) and osteochondritis dissecans (OCD) of the canine elbow-joint and hock-joint – literature review, diagnosis and therapy. *Vet Med Austria* 1991; 78: 414–424.
38. Wigger A, Tellhelm B, Kramer M, Rudorf H. Influence of femoral head and neck conformation on hip dysplasia in the German Shepherd dog. *Vet Radiol Ultrasound* 2008; 49: 243–248.
39. Wosar MA, Lewis DD, Neuwirth L, et al. Radiographic evaluation of elbow joints before and after surgery in dogs with possible fragmented medial coronoid process. *J Am Vet Med Assoc* 1999; 214: 52–58.

Diagnostische Wertigkeit von Computertomographie und Magnetresonanztomographie für die Diagnose einer Koronoiderkrankung beim Hund

S. Klumpp¹; N. Ondreka¹; K. Amort¹; M. Zwick¹; K. Gesierich²; M. Engert¹; S. Tacke¹; K. Failing³; M. Kramer¹

¹Klinik für Kleintiere, Chirurgie (Prof. M. Kramer), Justus-Liebig-Universität Gießen; ²Klinik für Kleintiere, Innere Medizin (Prof. R. Neiger), Justus-Liebig-Universität Gießen;

³Arbeitsgemeinschaft Biomathematik (Dr. K. Failing), Justus-Liebig-Universität Gießen

Schlüsselwörter

Fragmentierter Processus coronoideus medialis ulnae, bildgebende Verfahren, Ellbogengelenkdysplasie, Wertigkeit

Zusammenfassung

Gegenstand: Diagnostische Wertigkeit der Computertomographie (CT) und der Magnetresonanztomographie (MRT) im Hinblick auf die Diagnose einer Koronoiderkrankung beim Hund. **Material und Methode:** Bei klinisch und röntgenologisch für eine Koronoiderkrankung am Ellbogengelenk verdächtigen Hunden wurden eine computertomographische und eine magnetresonanztomographische Untersuchung mit anschließender Arthroskopie des betroffenen Ellbogengelenks durchgeführt. **Ergebnisse:** Die Untersuchung erfasste 44 Ellbogengelenke von 44 Hunden. Bei den Patienten handelte es sich am häufigsten um Labrador Retriever (38,6%, n = 17), Mischlinge (22,7%, n = 10) und Golden Retriever (11,4%, n = 5). Insgesamt waren 11 Rassen vertreten. Das Alter der 30 Rüden (68%) und 14 Hündinnen (32%) lag zwischen 6 und 117 Monaten (Durchschnitt 2,25 Jahre). Mittels Computertomographie ließen sich folgende Befunde erheben: a) Fissur im Bereich des Koronoids bei 66% (n = 29); b) Fragmente im Bereich des Koronoids bei 55% (n = 24); c) Deformation im Bereich des Koronoids bei allen 44 Gelenken; d) Dichteanstieg im Bereich der Koronoidbasis bei allen 44 Gelenken; e) heterogene Dichtestruktur im Bereich der Spitze des Processus coronoideus medialis ulnae bei 91% (n = 40). Die magnetresonanztomographischen Befunde umfassten: a) Fissur im Bereich des Koronoids bei 59% (n = 26); b) Fragmente im Bereich des Koronoids bei 57% (n = 25); c) Deformation im Bereich des Koronoids bei 86% (n = 38); d) Dichte im Koronoid nicht beurteilbar; e) Dichtestruktur nicht beurteilbar. **Schlussfolgerung und klinische Relevanz:** Beide Verfahren eignen sich zur Diagnostik einer Koronoiderkrankung beim Hund.

Key words

Fragmented coronoid process, elbow dysplasia, diagnostic value, diagnostic imaging

Summary

Objective: The diagnostic value of CT and MRI regarding the diagnosis of coronoid pathology in the dog. **Material and methods:** Computed tomography (CT) and magnetic resonance imaging (MRI) of the elbow joint were performed in dogs with clinical and radiological signs of coronoid pathology. Afterwards, all dogs underwent arthroscopic surgery. For the computed tomographic examination, a 16-slice-CT-scanner spiral-CT (Philips Brilliance 16) was used. The MRI-examination was performed with a 1-Tesla superconducting magnet (Phillips Intera 1.0). T1 and T2 weighted images with different sequences were acquired. **Results:** In total, 44 elbow joints from 44 patients (total of 12 breeds, including mixed breeds) were examined. The most represented breeds were Labrador Retrievers (38.6%, n = 17), mixed breed dogs (22.7%, n = 10) and Golden Retrievers (11.4%, n = 5) were represented most. The age of the 30 male dogs (68%) and 14 female dogs (32%) ranged from 6 to 117 months (mean 2.25 years). Using CT, the following results could be evaluated: a) fissure at the level of the Processus coronoideus medialis ulnae (PCM) in 66% (n = 29); b) fragments at the level of the PCM in 55% (n = 24); c) deformation at the level of the PCM in all 44 joints; d) increased opacity at the level of the base of the PCM in all 44 joints; e) heterogenous opacity at the apex of the PCM in 91% (n = 41). With MRI, the following results could be evaluated: a) fissure at the level of the PCM in 59% (n = 26); b) fragments at the level of the PCM in 57% (n = 25); c) deformation at the level of the PCM in 86% (n = 38); d) increased opacity at the level of the base of the PCM, thus making assessment impossible; e) heterogenous opacity at the apex of the PCM, thus making assessment impossible. **Conclusion and clinical relevance:** Both diagnostic imaging modalities are appropriate for evaluating coronoid pathology in the dog.

Korrespondenzadresse

Dr. Stephan Klumpp
Klinikum Veterinärmedizin
Klinik für Kleintiere
Justus Liebig Universität Gießen
Frankfurter Straße 108
35392 Gießen
E-Mail: Stephan.Klumpp@gmx.net

Diagnostic value of CT and MRI for the diagnosis of coronoid pathology in the dog

Tierärztl Prax 2010; 38 (K): 7–14
Eingegangen: 14. Oktober 2009
Akzeptiert: 27. Oktober 2009

Einleitung

Der Begriff Ellbogengelenksdysplasie fasst mehrere Erkrankungsbilder zusammen, die zu einer Lahmheit der Vordergliedmaße führen können. Nach der Definition durch die International Elbow Working Group (IEWG) werden die auftretenden pathologischen Veränderungen in fragmentierten bzw. deformierten Processus coronoideus medialis ulnae (FCP), isolierten Processus anconaeus (IPA), Osteochondrosis dissecans (OCD) der Humeruskondylen sowie Inkongruenz innerhalb des Ellbogengelenks unterteilt (7). Die häufigste beim jungen Hund großwüchsiger Rassen auftretende Form der Ellbogengelenksdysplasie ist die Erkrankung des Processus coronoideus medialis ulnae (PCM).

Der Begriff „fragmentierter Processus coronoideus medialis ulnae“ beschreibt nicht alle im Bereich des Koronoids vorkommenden pathologischen Veränderungen. Eine Vielzahl unterschiedlicher Knorpelläsionen mit oder ohne Fragmentation des medialen Koronoids können vorliegen. Ebenso kann die Erkrankung mit oder ohne Knorpelerosion der angrenzenden Humeruskondylen einhergehen (sog. „kissing lesion“). Bezugnehmend auf Moore et al. (11) sollte der Begriff „Koronoiderkrankung“ Verwendung finden, um das gesamte Spektrum der pathologischen Veränderungen im Bereich des Processus coronoideus medialis ulnae abzudecken.

Verschiedene Untersucher (5, 15) vermuten, dass die radioulnare Inkongruenz ebenfalls eine Rolle in der Pathogenese der Koronoiderkrankung spielt. Im Hinblick auf die Diagnose der primären Erkrankung als Ursache für die Ellbogengelenksdysplasie verfügen konventionelle Röntgenuntersuchungen aufgrund der Summationsbildgebung und ihrer damit verbundenen geringen Sensitivität und Spezifität über eine limitierte Aussagekraft (9, 21). Obwohl röntgenologische Schrägprojektionen (kraniallaterale[15°]-kaudomediale bzw. distomediale-proximolaterale Schrägprojektion) des kaninen Ellbogengelenks die Sensitivität der Röntgenuntersuchung zur Erkennung einer Koronoiderkrankung steigern (6, 22), gibt es keine radiologische Projektion, die eine Darstellung der axialen Koronoidgrenze ohne Überlagerung mit anderen knöchernen Strukturen erlaubt (12, 18). Aufgrund dieser Nachteile basiert die abschließende Diagnose „Koronoiderkrankung“ häufig auf der Detektion sekundärer radiologischer Veränderungen (osteophytäre Zubildungen in verschiedenen Gelenkabschnitten oder Sklerose der Incisura trochlearis und kaudal im Bereich der Koronoidbasis) (3). Die Computertomographie (CT) ermöglicht dagegen, primäre Läsionen als solche zu erkennen. Sie ist sensitiver als die konventionelle Radiologie im Hinblick auf die Identifikation von Fragmenten im Bereich des medialen Koronoids. Mittels CT kann bei nahezu der Hälfte der untersuchten Gelenke eine röntgenologisch nicht nachweisbare Koronoiderkrankung diagnostiziert werden (4, 13, 14). Dieser Unterschied lässt sich damit erklären, dass die CT eine überlagerungsfreie Beurteilung des medialen Koronoids erlaubt. Eine Darstellung des Knorpels ist jedoch nicht möglich, da Knorpelgewebe aufgrund seiner Dichte computertomographisch nicht von anderen Weichteilgeweben unterschieden werden kann.

Die Arthroskopie ermöglicht die direkte Visualisierung primärer Läsionen des Koronoids sowie die Beurteilung der Knorpeloberfläche (10, 18–20). Aus diesem Grund wird die Arthroskopie häufig als der „Goldstandard“ zur klinischen Beurteilung von Knorpelschäden im Ellbogengelenk angesehen. Die Computertomographie und die Arthroskopie sind für die Diagnose einer Koronoiderkrankung zwei sich ergänzende diagnostische Verfahren (11).

Sowohl in der Humamedizin als auch in der Veterinärmedizin wird die Magnetresonanztomographie (MRT) zur Diagnostik von pathologischen Veränderungen an Sehnen, Knochen, Knorpel und Weichteilen der Gelenke herangezogen (1, 2). Snaps et al. (16) verglichen bei Hunden mit Ellbogendysplasie die Befunde der Magnetresonanztomographie mit den durch Arthrotomie erhobenen Befunden. Nach dieser Studie ist die MRT ein nützliches Verfahren zur Diagnose einer Koronoiderkrankung, speziell bei unklaren radiologischen Befunden. In einer weiteren Studie evaluierten die gleichen Autoren verschiedene MRT-Sequenztypen zur Diagnostik am kaninen Ellbogengelenk (17). Nach dieser Arbeit ist es jedoch beim Hund aufgrund der wesentlich kleineren anatomischen Verhältnisse als beim Menschen nicht möglich, gegenüberliegende Knorpelschichten getrennt voneinander darzustellen. Ziel der vorliegenden Studie war, die Wertigkeit der Schnittbildverfahren CT und MRT für die Diagnose einer Koronoiderkrankung beim Hund vergleichend bestimmen.

Material und Methode

Probanden

In die Studie gingen Hunde ein, bei denen aufgrund der klinischen und röntgenologischen Untersuchung der Verdacht einer Koronoiderkrankung bestand. Bei allen Tieren handelte es sich um Patienten der Klinik für Kleintiere, Chirurgie, der Justus-Liebig-Universität Gießen, die im Zeitraum von November 2007 bis Oktober 2008 vorgestellt wurden. Die Anästhesie erfolgte mit L-Methadon (0,5 mg/kg KM i. v.; L-Polamivet, Intervet, Unterschleißheim) und Diazepam (0,5–1 mg/kg KM i. v.; Diazepam Ratiopharm). Bis zur Intubationsfähigkeit erhielten die Hunde 2–4 mg/kg KM Propofol i. v. (Essex). Nach der Intubation wurde die Anästhesie mit Isofluran in 100% Sauerstoff aufrechterhalten. Unter Zugrundelegung der endexpiratorischen Kohlendioxidkonzentration erfolgte eine kontrollierte Beatmung. Zur Überwachung der Patienten während der Anästhesie dienten EKG, Pulsoximetrie und Kapnographie. Die anästhesierten Hunde wurden computertomographisch, magnetresonanztomographisch und anschließend arthroskopisch untersucht.

Computertomographie

Für die computertomographische Untersuchung stand ein 16-zeiliges Spiral-CT (Philips Brilliance 16) zur Verfügung. Die Hunde

Tab. 1

Angewandte Sequenzparameter für die Untersuchung der Ellbogengelenke (FOV = Field of View, TR = Repetitionszeit, TE = Echozeit)

Sequenzen	FOV (mm)	Schichtdicke (mm)	Matrix	TR (ms)	TE (ms)
T2wTSE sagittal	170	2	258/800	2462	100
T1wSE transversal	140	2,5	192/512	868	17
T2wFFE dorsal	140	2	192/528	450	10
T2wFFE transversal	140	2	179/528	450	10

wurden in Rückenlage mit nach vorne gestreckten Vordergliedmaßen auf der CT-Liege positioniert. Zur Untersuchung wurden ein kleines, an die Ellbogengelenke angepasstes Field of View, 140 kV Röhrenspannung sowie ein Knochenrekonstruktionsalgorithmus gewählt. Die Schichtdicke der in transversaler Schichtausrichtung kontinuierlich erstellten Schnittbilder betrug 1 mm.

Magnetresonanztomographie

Für die magnetresonanztomographische Untersuchung diente ein Hochfeldmagnet (Philips Intera 1,0 Tesla). Zur Bildacquisition wurde eine Kombination aus Wirbelsäulenspule (Field of View 45 cm) und C3-Oberflächenringpule (Durchmesser 13,5 cm) verwendet. Die Lagerung des Patienten erfolgte in Seitenlage mit spulennaher Positionierung des zu untersuchenden Ellbogengelenks auf der Wirbelsäulenspule. Die betroffene Gliedmaße wurde nach kranial ausgestreckt und die C3-Oberflächenringpule direkt auf Höhe des Ellbogengelenks platziert. Dies erlaubte die Anfertigung von Übersichtsaufnahmen mit einem großen Field of View, die die Planung der Schichtausrichtung der einzelnen Sequenzen erleichterten. Die eigentlichen Untersuchungssequenzen wurden dann über die C3-Oberflächenringpule aquiriert. So ließen sich hochauflösende Schichtaufnahmen auf Höhe des Processus coronoideus medialis ulnae erzeugen. Das angewandte Untersuchungsprotokoll wurde in Anlehnung an ein humanmedizinisches Standarduntersuchungsprotokoll zur MRT-Diagnostik am Ellbogengelenk ausgewählt (1). Bei der Sequenzeinstellung erfolgte eine Anpassung an die geringeren Gelenkmaße beim Hund im Vergleich zum Menschen (► Tab. 1).

Im Anschluss an die computertomographische und magnetresonanztomographische Untersuchung wurde eine Arthroskopie der Ellbogengelenke durchgeführt.

Erfasste Veränderungen

Folgende Veränderungen wurden soweit möglich bei den drei Verfahren erfasst und dokumentiert:

- Fissur auf Höhe des medialen Koronoids
- Fragment auf Höhe des medialen Koronoids
- Deformation des medialen Koronoids
- erhöhte Dichte der Koronoidbasis
- heterogene Dichte der Koronoidspitze

Die Parameter d und e lassen sich weder mittels Magnetresonanztomographie noch mittels Arthroskopie erheben.

Statistische Auswertung

Alle Berechnungen erfolgten mithilfe des Statistikprogramms BMDP/Dynamic (Release 7.0). Um die Genauigkeit der MRT festzustellen, wurde eine dreidimensionale Häufigkeitsauszählung mit dem Programm BMDP 4F durchgeführt. Als statistisch signifikant galten p-Werte < 0,05.

Ergebnisse

Patientendaten

Dokumentation und Auswertung erstreckten sich auf 44 Gelenke von 44 Hunden. Neben Mischlingen 22,7% (n = 10) waren von den 11 vorkommenden Rassen Labrador Retriever 38,6% (n = 17) und Golden Retriever 11,4% (n = 5) am häufigsten vertreten. Das Alter der 30 Rüden (68%) und 14 Hündinnen (32%) lag zwischen 6 und 117 Monaten (Durchschnitt 2,25 Jahre).

CT-, MRT- und Arthroskopiebefunde

Fissur auf Höhe des medialen Koronoids

Fissuren im Bereich des Processus coronoideus medialis ulnae ließen sich computertomographisch in 29 (66%) Ellbogengelenken und magnetresonanztomographisch in 26 (59%) Gelenken nachweisen (► Abb. 1). Zwischen beiden Methoden bestand kein signifikanter Unterschied. Bei der arthroskopischen Untersuchung fand sich in 15 (34%) Fällen eine Fissur im Bereich des medialen Koronoids, die mittels CT bei 12 und mittels MRT bei 14 Gelenken darstellbar war. Alle computertomographisch nachweisbaren Fissuren fielen auch bei der MRT auf. Unter Zugrundelegung der Arthroskopie als „Goldstandard“ zeigte sich bei den Resultaten von CT und MRT kein statistisch signifikanter Unterschied.

Fragment/e auf Höhe des medialen Koronoids

Die CT zeigte bei 24 (54%) Ellbogengelenken eine Fragmentation des medialen Koronoids, während eine solche mittels MRT in 25 (57%) Fällen nachgewiesen wurde (► Abb. 2). Bei vier Ellbogengelenken waren die computertomographisch dargestellten Fragmente mittels MRT nicht nachzuweisen. In fünf Fällen konnten computertomographisch eine in der MRT diagnostizierte Frag-

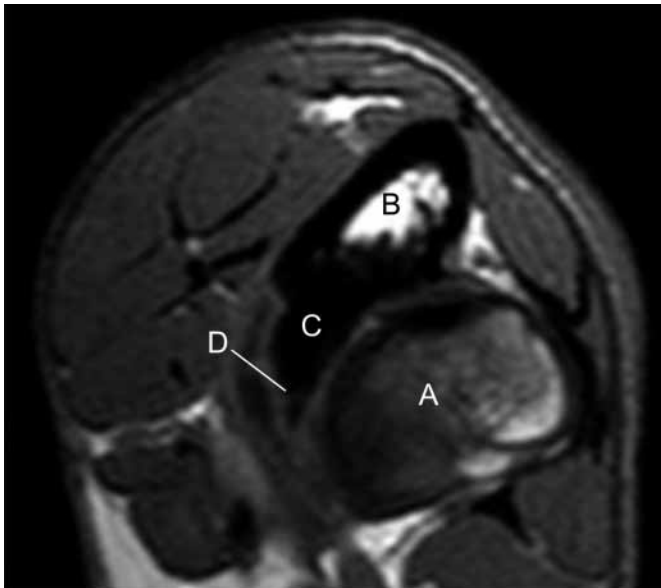


Abb. 1a MRT T2wSE transversal auf Höhe des Processus coronoideus medialis ulnae (Patient Nr. 5). Die Spitze des medialen Koronoids wird von einer signalintensiven Linie (D, hell) im Sinne einer Fissurlinie im Bereich der Koronoidspitze durchzogen. A = Radius, B = Ulna, C = Basis des Processus coronoideus medialis ulnae.

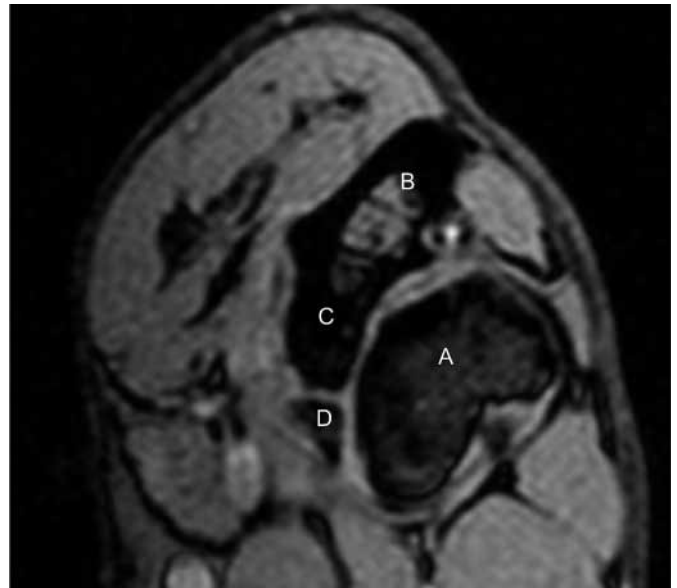


Abb. 2a MRT T1wSE transversal auf Höhe des Processus coronoideus medialis ulnae (Patient Nr. 3). Im Bereich der Spitze des Processus coronoideus medialis ulnae findet sich eine isolierte, gut begrenzte Struktur, die sich isointens zu Radius respektive Ulna darstellt und damit als Fragment angesprochen werden kann. A = Radius, B = Ulna, C = Basis des Processus coronoideus medialis ulnae, D = Fragment.



Abb. 1b CT transversal auf Höhe des Proc. coronoideus medialis ulnae (Patient Nr. 5). In der axialen Basis des Proc. coronoideus medialis ulnae zeigt sich eine radioulnar einziehende Aufhellungslinie (Fissur). A = Radius, B = Ulna, C = Basis des Processus coronoideus medialis ulnae, D = Fissurlinie.

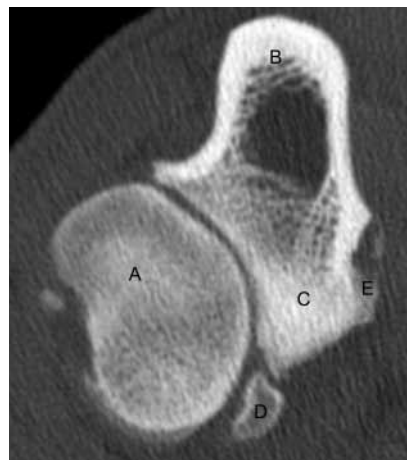


Abb. 2b CT transversal auf Höhe des Proc. coronoideus medialis ulnae (Patient Nr. 3). Im Bereich der Koronoidspitze zeigt sich ein kalkdichtes Fragment mit Dislokation (D). A = Radius, B = Ulna, C = Basis des Processus coronoideus medialis ulnae, E = osteophytäre Zubildungen an der abaxialen Koronoidbasis.

mentation nicht bestätigt werden. Bei 14 (32%) Gelenken wurden bei der arthroskopischen Untersuchung Fragmente festgestellt. In 11 (25%) Fällen ließen sich computertomographisch Fragmente darstellen, die arthroskopisch nicht nachweisbar waren. Zwischen CT und MRT bestand im Hinblick auf die Diagnose von Fragmenten im Bereich des medialen Koronoids kein signifikanter Unterschied.

Deformation im Bereich des medialen Koronoids

Die CT detektierte in allen 44 untersuchten Gelenken eine Deformation im Bereich der Koronoidspitze, während magnetreso-

nantomographisch der Nachweis einer Deformation in 38 (86%) Fällen gelang (►Abb. 3). Die Arthroskopie bestätigt in 40 (91%) Gelenken die Diagnose einer Deformation der Koronoidspitze. Zwischen den drei Methoden ergab sich kein signifikanter Unterschied.

Erhöhte Dichte im Bereich der Koronoidbasis

Alle 44 Gelenke zeigten bei der computertomographischen Untersuchung eine erhöhte Dichte im Bereich der Koronoidbasis (►Abb. 4). Die Evaluierung dieses Parameters ist weder mittels MRT noch mithilfe der Arthroskopie möglich.

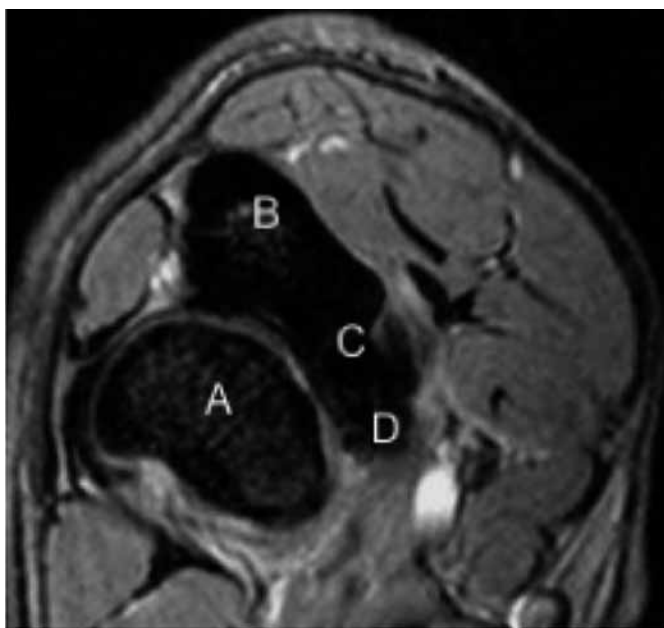


Abb. 3a MRT T1w TSE transversal auf Höhe des Proc. coronoideus medialis ulnae (Patient Nr. 14). Die Spitze des Processus coronoideus medialis ulnae zeigt einen unregelmäßigen Verlauf der Randbegrenzung (D), der eine Deformation im Bereich der Koronoidspitze darstellt. A = Radius, B = Ulna, C = Basis des Processus coronoideus medialis ulnae.

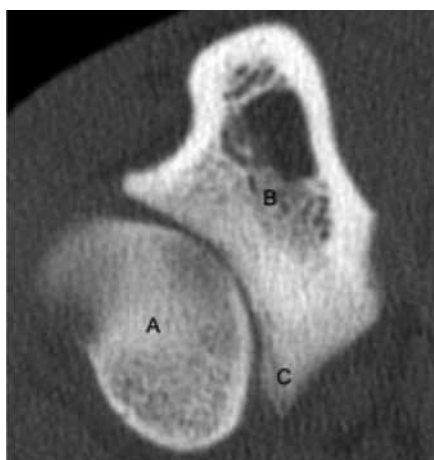


Abb. 3b CT transversal auf Höhe des Proc. coronoideus medialis ulnae (Patient Nr. 14). Die Spitze des medialen Koronoids zeigt eine Deformation (C). A = Radius, B = Ulna.

Heterogene Dichte im Bereich der Koronoidspitze

Ein heterogenes Dichtemuster im Bereich der Koronoidspitze konnte bei 40 Gelenke computertomographisch festgestellt werden (►Abb. 4). Die Evaluierung dieses Parameters ist weder magnetresonanztomographisch noch arthroskopisch möglich.

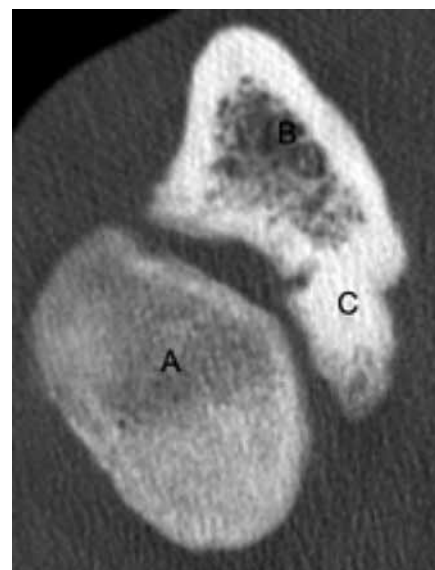


Abb. 4 CT transversal auf Höhe des Proc. coronoideus medialis ulnae (Patient Nr. 21). Dichtezunahme im Bereich der Basis sowie heterogenes Dichtemuster im Bereich der Spitze des Processus coronoideus medialis ulnae (C). A = Radius, B = Ulna.

Diskussion

Die Studie zeigt, dass sowohl CT als auch MRT vergleichbare Ergebnisse in der Diagnostik der Koronoiderkrankung am Ellbogengelenk des Hundes liefern. Bei den Kriterien Fissur oder Fraktur auf Höhe des medialen Koronoids sowie Deformation des medialen Koronoids kann kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Verfahren festgestellt werden.

Fissur auf Höhe des medialen Koronoids

Im Hinblick auf die Identifikation von Fissuren im Bereich des medialen Koronoids besteht zwischen CT und MRT kein signifikanter Unterschied. Moore et al. (11) können bei 23 von 101 (23%) computertomographisch untersuchten Ellbogengelenken eine Fissur diagnostizieren. Die Arthroskopie weist in dieser Studie in 12 Fällen (12%) ein nicht disloziertes Fragment bzw. eine Fissurlinie nach. Die Arthroskopie gilt als sehr sensitives Verfahren zur Beurteilung der Gelenkoberfläche, da eine direkte visuelle Beurteilung der Knorpeloberfläche möglich ist (8). In der vorliegenden Studie ließ sich lediglich in 34% (n = 15) der Fälle eine computertomographisch nachgewiesene Fissur arthroskopisch bestätigen. Alle arthroskopisch diagnostizierten Fissuren konnten jedoch sowohl mittels CT als auch mittels MRT diagnostiziert werden. Ginge man davon aus, dass die beiden Schnittbildverfahren die Realität abbilden, ist es durchaus vorstellbar, dass eine Fissurlinie in der Arthroskopie durch eine makroskopisch unveränderte Knorpelschicht maskiert wird und deshalb dem Nachweis entgeht.

Die MRT liegt mit 90% identifizierter Fissurlinien sehr nahe an den Ergebnissen der CT. Die Resultate unserer Untersuchung bestätigen die Daten von Snaps et al. (16), die bei 90% (n = 20) der untersuchten Fälle eine Fissur magnetresonanztomogra-

phisch nachweisen konnten. Der Vergleich erfolgte in dieser Studie mit den Befunden der Arthrotomie. Der geringe Unterschied zwischen beiden Schnittbildverfahren kann mit der bei der MRT höheren Schichtdicke (2 mm) im Vergleich zur CT (1 mm) erklärt werden. In der vorliegenden Studie konnte in allen Fällen einer mittels CT und MRT diagnostizierten Fissurlinie auch arthroskopisch die Diagnose Koronoiderkrankung im Sinne einer pathologischen Veränderung gestellt werden, auch wenn – wie oben ausgeführt – die Fissur selbst nicht immer arthroskopisch feststellbar war. Festzuhalten ist, dass die Darstellung einer Fissurlinie im CT bzw. MRT pathognomonisch für eine Koronoiderkrankung ist.

Fragmente auf Höhe des medialen Koronoids

Bei 54% (n = 24) der 44 untersuchten Ellbogengelenke war es mittels CT möglich, Fragmente im Bereich des medialen Koronoids zu diagnostizieren. Die MRT zeigte Fragmente in 57% (n = 25) der Fälle. Dieser Unterschied von einem Fall kann gut durch eine Fehlinterpretation von Fissurlinien erklärt werden, die ein Fragment ohne Dislokation isolieren, jedoch in der CT keinen Kontakt zur Gelenkoberfläche haben. In 27% (n = 11) der Fälle wurde die mittels CT und MRT nachgewiesene Fragmentation arthroskopisch nicht diagnostiziert. Diese Befunde bestätigen die Ergebnisse von Moore et al. (6), die bei 23% (n = 23) der untersuchten Gelenke zwischen CT und Arthroskopie differierende Resultate feststellten. Knorpelige Fragmente entgehen in der CT dem Nachweis, weil sie nicht dargestellt werden können. Die in unserer Studie angewandten MRT-Sequenzen lassen eine Identifikation von kleinen knorpeligen Fragmenten ebenfalls nicht zu, womit die Diskrepanz zwischen CT und MRT auf der einen und der Arthroskopie auf der anderen Seite erklärt werden könnte. Knöcherner Fragmente, die arthroskopisch nicht nachweisbar sind, könnten während der arthroskopischen Manipulation ihre Lage verändern und so dem Nachweis entgehen. Ein arthroskopisch nicht disloziertes Fragment kann in der CT und MRT als Fissur angesprochen und somit einer anderen Gruppe zugeordnet werden (4, 11, 20).

Eine weitere Ursache für den fehlenden arthroskopischen Nachweis mittels Schnittbildverfahren erkannter Fragmente können nach Literaturangaben intrakapsuläre Metaplasien auf Höhe des medialen Koronoids sein (11, 20). Diese Theorie lässt sich in unserer Studie nicht bestätigen. In keinem der untersuchten Gelenke wurden mithilfe der Schnittbildverfahren mineraldichte Strukturen innerhalb der Gelenkkapsel nachgewiesen.

Sowohl in der CT als auch in der MRT werden Fragmente durch eine lineare, gut begrenzte Aufhellungslinie (CT) bzw. ein deutlich signaldifferentes Areal im Bereich des Processus coronoideus medialis ulnae erkannt. Arthroskopisch kann in diesen Fällen ein Fragment nicht immer sicher angesprochen werden, da bei fehlender Dislokation des Fragments eine Unterscheidung zur reinen Fissurlinie teilweise nicht möglich ist. Oftmals werden diese Veränderungen vom Operateur als Fissur beschrieben, aus

der dann im Laufe der Arthroskopie ein Fragment entwickelt werden kann. Aus diesem Grund lassen sich die Diagnosen Fissur (Arthroskopie) und Fragment (CT/MRT) nicht als vollständig voneinander unabhängige Befunde einstufen. In der vorliegenden Studie wird offensichtlich, dass die präoperative Diagnose eines Fragments mittels CT bzw. MRT die Interpretation einer arthroskopisch dargestellten Fissurlinie durch den Operateur beeinflusst und ein teils aggressiveres operatives Vorgehen zur Folge hat. In allen Fällen einer mittels CT bzw. MRT diagnostizierten Fragmentation war auch arthroskopisch eine Koronoiderkrankung nachweisbar.

Deformation im Bereich des medialen Koronoids

Eine Deformation im Bereich der Koronoidspitze ließ sich computertomographisch bei allen Gelenken (n = 44) und mittels MRT bei 86% (n = 38) der untersuchten Gelenke feststellen. Dieser Befund kann ein sensitiver und zugleich spezifischer Marker für das Vorliegen einer Koronoiderkrankung sein, wenn Fissur oder Fragment fehlen. Reichle et al. (13) beschreiben ebenfalls eine Deformation der Koronoidspitze bei Hunden mit Koronoiderkrankung. Obwohl beim Koronoid geringe Formunterschiede zwischen den unterschiedlichen Hunderassen und (inter)individuell bestehen, ist die mittels CT und MRT diagnostizierte Deformation im Bereich der Koronoidspitze als ein Teil der Koronoiderkrankung anzusehen, da arthroskopisch in 40 (91%) Gelenken ebenfalls eine Koronoiderkrankung diagnostiziert wurde. Zur Klärung, ob die vier arthroskopisch unauffälligen Gelenke tatsächlich negativ für das Vorliegen einer Koronoiderkrankung sind, bedarf es weiterführender histopathologischer Untersuchungen.

Erhöhte Dichte im Bereich der Koronoidbasis

Computertomographisch wurde in allen Fällen (n = 44) eine Dichtezunahme im Bereich der Koronoidbasis nachgewiesen. Die arthroskopische Untersuchung zeigte bei 91% (n = 40) der Hunde mit erhöhter Dichte im Bereich der Koronoidbasis das Vorliegen einer Koronoiderkrankung. Moore et al. (11) können bei 85% (n = 86) der untersuchten Ellbogengelenke ebenfalls eine erhöhte Dichte der Koronoidbasis nachweisen. Somit wird vermutet, dass dieser Befund für die Diagnose einer Koronoiderkrankung von Bedeutung ist, insbesondere wenn keine Fissuren oder Fragmente vorliegen. Eine Dichtezunahme in der Koronoidbasis als computertomographisch früh erkennbare Veränderung einer Koronoiderkrankung würde eine zeitnahe Diagnose und somit eine frühere Therapie dieser Erkrankung ermöglichen. Um dies zu bestätigen, sind weitere Untersuchungen an gesunden Ellbogengelenken zur Darstellung der normalen anatomischen Verhältnisse in CT und MRT erforderlich.

Magnetresonanztomographisch kann keine Aussage über eine Zunahme der Knochendichte erfolgen, da Knochengewebe an sich nur ein sehr geringes respektive gar kein Signal abgibt.

Heterogene Dichte im Bereich der Koronoidspitze

Bei 91% (n = 40) der untersuchten Ellbogengelenke konnte computertomographisch eine heterogene Dichte im Bereich des Knochens der Koronoidspitze dargestellt werden. Es zeigten sich Areale, die eine verminderte Dichte aufwiesen, sowie Areale mit erhöhter Dichte. Dies widerspricht den Untersuchungen von Moore et al. (11), die lediglich bei 12% (n = 12) von 101 untersuchten Gelenken eine heterogene Dichtestruktur im Bereich der Koronoidspitze diagnostizierten. Dieser Unterschied lässt sich letztendlich nur anhand einer Dichtemessung an klinisch unauffälligen (gesunden) Ellbogengelenken klären. Aufgrund der großen Übereinstimmung zwischen CT und Arthroskopie in unserer Studie könnte der Befund einer heterogenen Dichte an der Koronoidspitze nach jetzigem Kenntnisstand für die Beurteilung eines Ellbogengelenks im Hinblick auf die Diagnose einer Koronoiderkrankung von Bedeutung sein. Dies würde gegebenenfalls eine zeitlich frühere Diagnose der Koronoiderkrankung und somit eine frühzeitigere Therapie ermöglichen. Zur Verifizierung dieses Befundes sind jedoch computertomographische Untersuchungen zu den normalen anatomischen Dichteverhältnissen im Bereich der Koronoidspitze an gesunden Ellbogengelenken notwendig. In der MRT kann dieser Befund nicht erhoben werden. Dies hat die gleichen Gründe wie bei der Beurteilung einer Dichtezunahme im Bereich der Koronoidbasis (Signalverhalten von Knochengewebe: dunkel in T1 und T2).

Der Vergleich von CT und MRT im Hinblick auf ihre diagnostische Wertigkeit zur Abklärung einer Koronoiderkrankung zeigt, dass sich beide Verfahren sehr gut eignen. Bei der Computertomographie ergibt sich jedoch ein deutlicher Zeitvorteil. Die Untersuchungszeit der CT beträgt ca. 10 Minuten für beide Gelenke, während für eine MRT ca. 35 Minuten pro Gelenk erforderlich sind. Die Ergebnisse von Snaps et al. (16) können im Hinblick auf die Magnetresonanztomographie bestätigt werden. Inwieweit die MRT unter Verwendung von 3D-Sequenzen mit einer Schichtdicke von unter einem Millimeter sowie unter Anwendung von knorpelsensitiven Untersuchungssequenzen eine zusätzliche Verbesserung der Diagnostik erbringt, gilt es abzuklären. Hinsichtlich der einzelnen Befunde ist bei Nachweis einer Fissur bzw. eines Fragments oder einer Deformation im Bereich der Koronoidspitze die Diagnose einer Koronoiderkrankung zu stellen. Die Befunde Dichtezunahme an der Koronoidbasis sowie heterogenes Dichtemuster im Bereich der Koronoidspitze legen den Verdacht auf das Vorliegen einer Koronoiderkrankung nahe, reichen allerdings nach jetzigem Kenntnisstand allein für die sichere Diagnosestellung nicht aus. Sollte sich in Folgestudien herausstellen, dass die genannten Befunde das Vorliegen einer Koronoiderkrankung beweisen, wäre die CT insofern das der MRT überlegene Diagnostikum.

Fazit für die Praxis

Im Hinblick auf die Abklärung einer Koronoiderkrankung beim Hund besitzen Computertomographie und Magnetresonanztomographie den gleichen diagnostischen Wert. Beide Schnittbildverfahren ermöglichen eine präzise Diagnose und sind der konventionellen Röntgenuntersuchung deutlich überlegen. Die Computertomographie stellt das schnellere Verfahren dar, ermöglicht die zeitgleiche Untersuchung beider Ellbogengelenke und verursacht weniger Kosten als die Magnetresonanztomographie. Aus diesen Gründen ist die Computertomographie nach derzeitigem Kenntnisstand das Verfahren der Wahl für die Diagnostik am Ellbogengelenk des Hundes.

Literatur

1. Bittner RC, Hazim K, Helmig K. CT, EBT, MRT und Angiographie. Radiologische Untersuchungstechnik für MTAR und Ärzte. München: Urban & Fischer 2003; 252–253.
2. Brühshwein A, Flatz K, Zöllner M, Köstlin R, Matis U. Magnetresonanztomographie von Skelettmuskulatur und Sehnen in der Kleintiermedizin – Untersuchungstechnik und Erscheinungsbild verschiedener Erkrankungen sowie traumatischer Veränderungen. Tierärztl Prax 2008; 36 (K): 249–262.
3. Burton NJ, Comerford EJ, Bailey M, et al. Digital analysis of ulnar trochlear notch sclerosis in Labrador retrievers. J Small Anim Pract 2007; 48: 220–224.
4. Carpenter LG, Schwarz PD, Lorry JE, et al. Comparison of radiologic imaging techniques for diagnosis of fragmented medial coronoid process of the cubital joint in dogs. J Am Vet Med Assoc 1983; 203: 78–83.
5. Gemmill TJ, Clements DN. Fragmented coronoid process in the dog: is there a role for incongruency? J Small Anim Pract 2007; 48: 361–368.
6. Haudiquet PR, Marcellin-Little DJ, Stebbins ME. Use of the distomedial-proximolateral oblique radiographic view of the elbow joint for examination of the medial coronoid process in dogs. Am J Vet Res 2002; 63: 1000–1005.
7. International Elbow Working Group. 2001 International Elbow Protocol. Proceedings of the Annual Meeting of the Executive Committee of the IEWG, Vancouver, Canada, 2001.
8. Lewis DD, Parker RB, Hager DA. Fragmented medial coronoid process of the canine elbow. Continuing Education 1989; 11 (6): 703–715.
9. Mason DR, Schulz KS, Samii VF, et al. Sensitivity of radiographic evaluation of radio-ulnar incongruence in the dog in vitro. Vet Surg 2002; 31: 125–132.
10. Meyer-Lindenberg A, Langhann A, Fehr M, et al. Arthroscopy versus arthroscopy in the treatment of fragmented medial coronoid process of the ulna (FCP) in 421 dogs. Vet Comp Orthop Traumatol 2003; 16: 204–210.
11. Moores AP, Benigni L, Lamb CR. Computed tomography versus arthroscopy for detection of canine elbow dysplasia lesions. Vet Surg 2008; 37: 390–398.
12. Olsson SE. The early diagnosis of fragmented coronoid process and osteochondritis dissecans of the canine elbow joint. J Am Anim Hosp Assoc 1983; 19: 616–626.
13. Reichle JK, Park RD, Bahr AM. Computed tomographic findings of dogs with cubital joint lameness. Vet Radiol Ultrasound 2000; 41: 125–130.
14. Rovesti GL, Biasibetti M, Schumacher A, et al. The use of computed tomography in the diagnosis protocol of the elbow in the dog: 24 joints. Vet Comp Orthop Traumatol 2002; 15: 35–43.
15. Samoy Y, Van Ryssen B, Gielen I, et al. Review of the literature-elbow incongruency in the dog. Vet Comp Orthop Traumatol 2006; 19: 1–8.
16. Snaps FR, Balligand MH, Saunders JH, Park RD und Dondelinger RF. Comparison of radiography, magnetic resonance imaging, and surgical findings in dogs with elbow dysplasia. Am J Vet Res 1997; 58 (12): 1367–1370.
17. Snaps FR, Saunders JH, Park RD. Comparison of spin echo, gradient echo and fat saturation magnetic resonance imaging sequences for imaging the canine elbow. Vet Radiol Ultrasound 1998; 39: 518–523.

18. van Bree HJ, Van Ryssen B. Diagnostic and surgical arthroscopy in osteochondritis dissecans of the canine elbow joint. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1998; 28: 161–189.
19. Van Ryssen B, van Bree H, Simoens P. Elbow arthroscopy in clinically normal dogs. *Am J Vet Res* 1993; 54: 191–198.
20. Van Ryssen B, van Bree H. Arthroscopic findings in 100 dogs with elbow lameness. *Vet Rec* 1997; 140: 360–362.
21. Wagner K, Griffon DJ, Thomas MW, et al. Radiographic, computed tomographic and arthroscopic evaluation of experimental radio-ulnar incongruence in the dog. *Vet Surg* 2007; 36: 691–698.
22. Wosar MA, Lewis DD, Neuwirth L, et al. Radiographic evaluation of elbow joints before and after surgery in dogs with possible fragmented medial coronoid process. *J Am Vet Med Assoc* 1999; 214: 52–58.

Rezension

Basisversorgung von Vogelpatienten

Die kompetente tierärztliche Versorgung von Ziervogelpatienten ist noch immer lückenhaft, weil die Absolventen der Hochschulen und die Berufsanfänger über keine ausreichenden Grundkenntnisse und -fertigkeiten für die Untersuchung und Behandlung von Vögeln verfügen. – So liest sich im Vorwort die Auffassung der beiden Autoren und ihre Absicht, diesem Mangel mit ihrem Buch abzuwehren. Gegenwärtig ist die klinische Ausbildung der Studierenden erheblich intensiviert und sowohl auf praktische Fertigkeiten und theoretisches Wissen ausgerichtet worden.

Der Text beginnt mit „Steckbriefen“ der wichtigsten in tierärztlichen Praxen vorgestellten Vogelarten bzw. Vogelgruppen (Kanarienvogel, Zebrafinken, Wellen- und Nymphensittiche, Agaporniden, Graupapageien, Amazonen, Kakadus, Aras und Beos). Fast nicht berücksichtigt werden Tauben, Greifvögel und einheimische Wildvögel. Dem „Steckbrief“ folgen wesentliche anamnestiche Fragen zu häufigen Nahrungs- und Ernährungsfehlern sowie zum bisherigen Krankheitsgeschehen, die tierärztlicherseits den Vogelhaltern zu stellen sind. Der von den Autoren erprobte und bewährte klinische Untersuchungsgang einschließlich der erforderlichen Hilfsmittel wird im Detail beschrieben (Fangen, Fixieren, Wiegen, Palpation, Tupfer- und Blutentnahmen) und mit Farbbildern erläutert. Ein Hinweis auf das wichtige Protokollieren der Nummern auf den Fußringen zur Feststellung der Identität eines jeden Vogels fehlt hier. Anschließend werden die speziellen, auf einzelne Organsysteme und Krankheiten ausgerichteten Untersuchungsmethoden – reichlich mit Bildmaterial und Schemazeichnungen ausgestattet – beschrieben. Bei einem direkten Vergleich dieser Abbildungen mit denen in Monographien, die sich bereits auf dem Markt befinden, fallen

große inhaltliche Übereinstimmungen auf. Somit erhält die Leserschaft durch die zahlreichen Abbildungen kaum einen neuen, zusätzlichen Erkenntnisgewinn.

Es folgen ausgewählte hämatologische und blutchemische Angaben und die Methodik der Untersuchung von Kropfpulmaterial sowie von Tupfer- und Kotproben auf Parasiten, Bakterien und Pilze einschließlich der Interpretation der selbst erarbeiteten Ergebnisse. Auf eine Beschreibung der Möglichkeiten und Grenzen virologischer Untersuchungen dieser Proben wurde verzichtet. Dargestellt werden ebenfalls die Vorgehensweise und Aussagekraft der Röntgendiagnostik. Breiten Raum nehmen die Behandlungstechniken ein (Injektionen, Medikamentengaben via Schnabel oder Kropfsonde, Inhalation sowie Verbände). Den Abschluss dieses großen Kapitels bilden Möglichkeiten der „Behandlung“ durch Tierbesitzer (s. S. 56) sowie die tierärztliche Intensivmedizin bei Notfällen inklusive Narkose und Operationen. Nach diesen eher methodisch-technisch und sehr praktisch ausgerichteten Ausführungen folgen Kurzdarstellungen häufiger Erkrankungen in folgender, etwas willkürlich erscheinender Reihenfolge und Bezeichnung: Atemwegsmykosen, Leber- und Nierenerkrankungen, ZNS-Störungen, Würmen und Erbrechen, Durchfall, Kropfentzündung, Macrorhabdose, Neuropathische Drüsenmagendilatation, Vergiftungen, Psittakose/Ornithose, Ekto- und Endoparasiten sowie Befiederungsstörungen. Dieser für das Verständnis der Ätiologie und Pathogenese der Krankheiten sehr wesentliche Teil ist leider zu stark schematisiert und dadurch recht oberflächlich geblieben.

Ein sehr umfangreiches tabellarisches Verzeichnis gebräuchlicher Arzneimittel bildet einen wichtigen Anhang, wobei Wirkstoffe mit Handelsnamen, Dosierung, Indikationen und

Bemerkungen für die jeweiligen Arzneimittelgruppen genannt werden. Impfstoffe bleiben ungenannt. Angaben zu Herstellern von Produkten für die Vogelpraxis, eine Auswahl von acht Literaturempfehlungen und ein zweiseitiges Stichwortverzeichnis stehen am Ende.

Das Buch enthält gut lesbaren, meist eindeutig formulierten, oft aber zu knapp formulierten Text, zahlreiche, zum Teil schematische Abbildungen und viel freien Raum für Ergänzungen, Korrekturen und Kommentare der wissbegierigen Leserschaft.

Gewisse Mängel sind bei einer ersten Auflage trotz intensiver Lektoratsarbeiten wohl unvermeidlich. So wird bis Seite 50 von „Körpergewicht“ und danach von „Körpermasse“ geschrieben. Die in den Tabellen angegebenen Körpergewichte (richtig: Körpermasse gemäß den international üblichen SI-Einheiten) stimmen nicht immer überein. Trichomonaden sind in Abb. 4.2, S. 40 kaum zu erkennen. Farblich überlagerte Körperregionen in Röntgenaufnahmen verdecken mehr, als sie erklären sollen (z. B. Abb. 6.6 und 6.7). Aszitesflüssigkeit aus der Leibeshöhle kann anatomisch bedingt nicht in die Lunge fließen (s. S. 17, 31, 79), wenn nicht vorher der Brust- oder Bauchlufthals perforiert wurde. Der Titel bezieht sich auf „Vogelpatienten“, während im Text überwiegend der Ausdruck „Ziervogelpatienten“ verwendet wird.

Es bleibt abzuwarten, ob, wann und wie diesem Buch über die „Basisversorgung“ hinaus eine weitere Monographie über die spezielle, spezifische Versorgung der Ziervogelpatienten jenseits der nunmehr geschaffenen Basis folgen wird. An der Vogelmedizin interessierte Studierende und tierärztliche Berufsanfänger werden beim kritischen Lesen in diesem Buch zahlreiche, leicht zugängliche und praktisch sofort verwendbare Hinweise für die eigene Fortbildung und für die Verbesserung ihrer professionellen Tätigkeit finden können.

E. F. Kaleta, Gießen

V. Kostka, M. Bürkle, 120 S., Hannover: Schlütersche 2009, ISBN 978-3-89993-055-9, 39,90 €.

Improved Computed Tomography Accuracy with a 1-mm versus 2- or 3-mm Slice Thickness for the Detection of Medial Coronoid Disease in Dogs

Raffaella T. Zweifel¹ Pamela DiDonato¹ Antje Hartmann² Martin Kramer¹ Kerstin H. von Pückler¹

¹Department of Veterinary Clinical Sciences, Clinic for Small Animals, Justus Liebig University, Giessen, Germany

²Department of Diagnostic Imaging, Clinic for Small Animals Hofheim, Hofheim, Germany

Address for correspondence Raffaella T. Zweifel, DVM, Dr. med. vet, MRCVS, Department of Veterinary Clinical Sciences, Clinic for Small Animals, Justus Liebig- University, Frankfurter Straße 108, 35392 Giessen, Germany (e-mail: Raffaella.T.Zweifel@vetmed.uni-giessen.de).

Vet Comp Orthop Traumatol 2020;33:45–50.

Abstract

Objective Computed tomography (CT) is used complementarily to radiography for the evaluation of medial coronoid disease (MCD). We hypothesized that a slice thickness > 2 mm would significantly affect the image quality and detection of fragmentation of the medial coronoid process. This study aimed to assess CT features indicating direct and indirect evidence of MCD in 168 CT studies with slice thicknesses of 1-, 2- and 3 mm.

Materials and Methods The CT studies were blinded in terms of CT slice thickness and patient data and randomly assessed by two independent observers. All dogs underwent arthroscopic evaluation of the elbow joints. Both observers were unaware of the arthroscopic findings.

Results Notably, blurring of the bone contour ($p = 0.0001$) was significantly influenced by slice thickness; here, a 1-mm thickness yielded a predominantly sharp and well-defined bone contour (observer 1, 91%; observer 2, 79%), whereas 2- (observer 1, 39.3%; observer 2, 56.3%) and especially 3-mm slice thicknesses yielded blurred margins with significantly reduced sharpness (observer 1, 0%; observer 2, 12.5%). The 1-mm slice thickness also yielded the highest fragment detection rate (observer 1, 55.4%; observer 2, 60.4%). Furthermore, the detection of fragment positions and of single fragments and fissures differed substantially with slice thickness.

Clinical Relevance The findings of this study support the hypothesis that a CT slice thickness of ≥ 2 mm significantly affects fragment detection. In conclusion, a CT slice thickness of at least 1 mm is recommended for the assessment of MCD of the canine elbow.

Keywords

- ▶ computed tomography
- ▶ canine elbow
- ▶ fragmented coronoid process
- ▶ fragmented medial coronoid
- ▶ elbow dysplasia

Introduction

Fragmentation of the medial coronoid process (FCP) is a frequent sequela of medial coronoid disease (MCD) causing secondary osteoarthritic changes in the elbow joints of young dogs.^{1–4}

Arthroscopy is widely considered the gold standard for MCD evaluation in lame dogs.^{5,6} Some authors hypothesize that fragmentation originates within the subchondral bone

and progresses secondarily into the cartilage.⁷ Subchondral defects may therefore be overlooked on direct arthroscopic examination unless cartilage is physically probed. However, this method is invasive.

The existing literature describes a combination of computed tomography (CT) and arthroscopy as the most adequate method for a complete evaluation of the medial coronoid process (MCP).⁵

received

May 7, 2019

accepted after revision

September 24, 2019

published online

November 22, 2019

© 2020 Georg Thieme Verlag KG
Stuttgart · New York

DOI <https://doi.org/10.1055/s-0039-3399524>.
ISSN 0932-0814.

Computed tomography is a non-invasive diagnostic method with reported high levels of sensitivity (88.2%) and specificity (84.6%) for evaluating FCP. Therefore, CT is used complementarily to radiography in clinical cases with ambiguous radiographic findings and to detect early subchondral changes.^{8–10} The main benefit of CT is the capability to obtain a detailed and non-overlapping visualization of the subchondral bone.^{5,11,12} Accordingly, good CT image quality is required for an accurate assessment of the trabecular bone structure and subchondral bone contour of the MCP.

Computed tomography image quality depends on spatial resolution, artefacts and image noise. Here, slice thickness is inversely proportional to spatial resolution and image noise but proportional to the extent of blurring. With a greater slice thickness, small bone structures such as bone edges and bone contours are blurred and unsharp. With a smaller slice thickness, the bone structures are sharp but image noise may increase. The higher amount of image noise can be kept to a minimum by using a wide window setting and higher milliampère values. Previous reports have assumed that slice thickness affects CT image quality and the visibility of small fragments.^{5,6,13} Some authors have proposed the partial volume artefact as a main cause for reduced image quality.^{6,14} Therefore, literature reports on evaluations of the elbow joint recommend a slice thickness of <2 mm to increase spatial resolution and reduce slice thickness artifacts.¹⁵

In the authors' experience, the lack of an officially standardized CT protocol has led to the acquisition of CT studies with variable slice thicknesses across imaging centres. In some cases, a slice thickness of ≥ 2 mm results in misinterpretation of the data and missed MCP lesions. The International Elbow Working Group previously proposed breeding selection programs based on radiographic screening to exclude affected dogs.^{3,4} There has been an ongoing discussion about clinically applicable but reliable recommendations for CT settings during elbow scans in the context of breeding cases. To our knowledge, no published reports have investigated the influence of CT slice thickness on the evaluation of MCD in dogs.

The present study aimed to assess the effects of different slice thicknesses (1, 2 and 3 mm) on the detectability of different CT features of MCD of the canine elbow joint. We hypothesized that a slice thickness >2 mm reduces image quality and further expected that a slice thickness of ≥ 2 mm yields different results in an evaluation of CT features, leading to false-negative diagnoses of MCD. The results of the present study potentially serve as a basis for recommendations regarding CT slice thickness in this context and may contribute to the validation of a prospective standardized CT scanning protocol for the evaluation of canine elbow joints.

Materials and Methods

Selection and Description of Subjects

This study is featured a retrospective design. Computed tomography datasets were obtained from a previous (unpublished) prospective study of the canine elbow joint that was conducted under approval of the Institutional Animal Care and Use Committee (GI 18/17–Nr. A19/2011). All own-

ers consented to an inclusion of their data to this study. All dogs underwent orthopaedic and radiographic examinations, which depicted ambiguous features of MCD in at least one elbow joint. These dogs subsequently underwent simultaneous CT examination of both elbows. Datasets containing a complete depiction of the elbow joint were included. Afterwards, all dogs underwent arthroscopic examination of each limb performed by a board-certified specialist in orthopaedic surgery with more than 13 years of experience (C.P.). Dogs without arthroscopic examination of both forelimbs were excluded from the study. A board-certified veterinary radiologist with more than 11 years of experience (K.P.) and special expertise in musculoskeletal imaging made decisions regarding inclusion or exclusion.

Computed Tomography Examination

The dogs were examined under general anaesthesia with a combination of diazepam and levomethadon (0.5 mg/kg; KM diazepam-Ratiopharm 10 injection solution [Ratiopharm, Ulm, Germany] combined with 2–3 mg/kg KM L-Polamivet 2.5/0.125 mg/mL injection solution [Intervet, Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Germany]) and were positioned in dorsal recumbency for scanning. The thoracic limbs were arranged parallel and maximally extended cranially towards the gantry while fixed with bandages at the level of the carpal joint. The head was flexed caudolaterally. Both elbow joints were examined simultaneously.

All CT images were acquired using the same CT scanner (16-slice, Brilliance TM CT; Philips Medical Systems, Hamburg, Germany) and the same standardized CT protocol according to a previous study¹⁶ (helical mode, 140 kV, 104 mAs, 512 × 512 matrix, pitch 0.3, high-resolution bone filter and bone algorithm). Transverse images were initially acquired at a 1-mm slice thickness. After scanning, reconstructed scans were produced at slice thicknesses of 2 and 3 mm (reconstruction interval -1). The scan margin included the olecranon up to 2 cm distal to the radial head.

Assessment of Computed Tomography Features

Computed tomography studies of 1-mm slice thickness, each reconstructed with 2- and 3-mm slice thickness, were reviewed on a computer screen (Apple iMac 2,3 GHz Dual-Core Intel Core i5, Apple Inc. Cupertino, California, United States) in a randomized order. All studies were evaluated independently by two observers with expertise in diagnostic imaging. The first observer was an intern in diagnostic imaging (R.Z.) and the second observer was the board-certified veterinary radiologist (K.P.). Image data were assessed using a dedicated digital imaging and communications in medicine viewer (Osirix v.5.8.2; 32-bit; Pixmeo SARL Genf, Bern, Switzerland). The images were viewed in a multiplanar reconstruction and bone window (window width: +2500 Hounsfield units; window level: +500 Hounsfield units) after removing the patient data and imaged slice thickness from the display.

Evaluated structures within the elbow included the ulnar, radial and humeral bones. All CT images underwent initial subjective evaluation of the sharpness of the bone contours

to determine whether image blurring permitted the accurate delineation. Accepted images were then assessed according to a structured protocol with special regard to CT features of MCD. The imaging features were subdivided as follows: (1) Imaging features indicating direct evidence of MCD: (a) presence or absence of FCP; (b) the number of visible fragments; (c) the type of fragments (i.e. non-displaced/displaced), where non-displaced fragments appeared as a thin hypoattenuating line that completely separated the tip of the MCP from its base; (d) the location of the detected fragments (i.e. apical, medial or radial to the MCP), when multiple fragments were identified, type and location were based on the majority of the fragments; (e) presence or absence of a kissing lesion (accompanied by subchondral sclerosis when severe); presence or absence of fissure lines of the MCP (an incomplete hypoattenuating line without separation of a fragment); (g) presence or absence of hinted fissure lines (a faint and short fissure line); (h) course of present fissure lines (i.e. cranioaxial, caudoabaxial, mid-MCP, apical to MCP); (2) Imaging features indicating indirect evidence of MCD: (a) shape of the MCP (i.e. round, peaked, irregular or flattened); (b) apical subchondral hypoattenuation of the MCP; (c) apical and medullary bone sclerosis of the MCP and sclerosis of the humeral trochlea, radial head or radial incisure; (d) regularity or irregularity of the contour of the bone radial incisures; (e) secondary arthritic changes evaluated at the dorsal aspect of the anconeal process; the MCP itself; at the ulnar and radial bone contours; at the radial head and incisure as well as the trochlea and capitulum of the humeral condyle.

Statistical Analysis

The statistical analysis was performed by a specialist in biomathematics and statistics (K.F.) of the Department of Biomathematics and Data Processing Justus-Liebig University Giessen. A commercially available statistics software program (1993; BMDP Statistical Software, Inc.; Los Angeles, California, United States) was used for the analysis. All scans with accepted image quality were evaluated and included in the statistical analysis. For frequency counting each imaging feature was encoded with a numerical value (e.g. simple features: presence = 1; absence = 0; more complex features: apical = 1, medial = 2, or radial to the MCP = 3.). The significance was set at a p -value < 0.05.

To determine the effect of a slice thickness of 1, 2 or 3 mm on the detectability of different CT features of MCD, the statistical analysis was subdivided. The binomial Wald Test (i.e. generalized-linear-mixed-model-estimation) was used to reveal any differences between the various slice thicknesses (1, 2 and 3 mm). A descriptive correlation analysis of the values representing the CT features assessed at each slice thickness was conducted, and the data were presented as a cross-tabulation. The McNemar Test was used to test for discordance between the values of each CT feature in pairs of slice thicknesses (i.e. 1 and 2 mm, 2 and 3 mm and 1 and 3 mm), and 95% confidence intervals were calculated to demonstrate the coincidence of the coupled values. Kappa statistics were used to test the agreement of

the findings. Raw agreement and Cohen's kappa statistics were used to evaluate interobserver agreement and the effect of observer experience on CT image interpretation. The same methods were used for intermethod agreement of 1-mm thick CT slices (which normally provides the highest sharpness), with arthroscopic findings (i.e. the gold standard) regarding presence, type and number of fragments and fissures.

Results

Study Population

Twenty-eight client-owned dogs were presented with clinical signs of thoracic limb lameness at the Department of Veterinary Clinical Sciences at the Clinic for Small Animal Surgery Justus-Liebig University Giessen between 2012 and 2013. All dogs met the inclusion criteria. The sample comprised 18 male (7 neutered; 11 intact) and 10 female (4 neutered; 6 intact) dogs. Labrador Retrievers ($n=9$) and Bernese Mountain Dogs ($n=5$) were overrepresented in the sample population, which additionally included the following breeds: Irish Wolfhound ($n=1$), Broholmer ($n=1$), Elo ($n=1$), Border Collie ($n=2$), German Shepherd Dog ($n=1$), Hollandse Herdershond ($n=1$), Rottweiler ($n=1$), Australian Cattle Dog ($n=1$), Bordeaux dog ($n=1$), Entlebucher Mountain Dog ($n=1$), Akita Inu ($n=1$) and crossbreed dogs ($n=2$). The dogs' body weight ranged from 15.5 to 58.5 kg (median, 35.1 kg), and they ranged in age from 1 to 8 years (median, 4.5 years).

Assessment of Computed Tomography Features

For each dog one CT study (including both elbow joints) was acquired and two studies additionally reconstructed (three CT studies per elbow). A total of 168 CT studies were evaluated by observer 1. Observer 2 excluded eight elbow joints due to lack of image quality.

1) Imaging features indicating direct evidence of MCD:

Fragment detection was significantly affected by slice thickness (observer 1: $p=0.0001$; observer 2: $p=0.00383$). Fragment detection rate was highest with a slice thickness of 1 mm ($n=31/56$ [observer 1], $n=29/48$ [observer 2]). For both observers, the percentage of fragment detection decreased with increasing slice thickness (2 mm: $n=24/56$ [observer 1] and $n=25/48$ [observer 2]; 3 mm: $n=19/56$ [observer 1] and $n=20/48$ [observer 2]). For observer 2, fragments were reported with significant higher incidence for all slice thicknesses ($p=0.00383$) (→ Fig. 1).

For observer 1, the location of fragments significantly varied between different slice thicknesses: Out of 22 elbow joints with single or multiple fragments, apical fragments were most frequently identified with 1-mm slice thickness ($n=21/22$, $p=0.0003$), followed by fragments located at the radial head ($n=15/22$, $p=0.0001$) and medial to the MCP ($n=7/22$, $p=0.0001$). At a 3-mm slice thickness, fragments medial ($p=0.1025$) and radial to the MCP ($p=0.0253$) were more likely to be overlooked, compared with the 1-mm slice thickness ($p=0.0001$). Based on the number of detected fragments ($n=31$), single fragments were predominantly

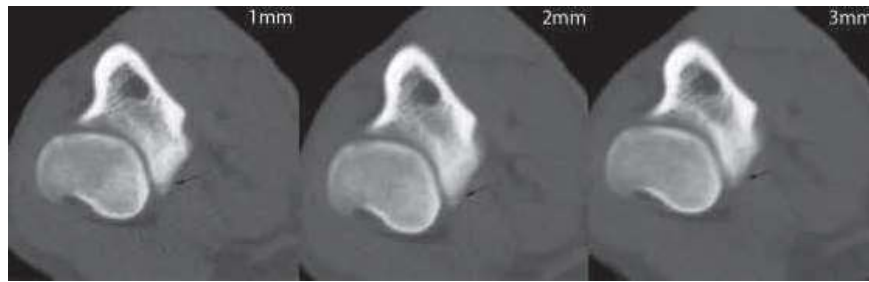


Fig. 1 Transverse computed tomography images obtained at 1-, 2- and 3-mm slice thicknesses (from left to right) at the level of the medial coronoid process of the canine elbow. The 1-mm slice shows a clearly delineated, thin, hypoattenuating fracture line (arrow) isolating the tip of the medial coronoid process. The fracture line becomes increasingly blurred and indistinct at a 2-mm slice thickness. No fracture line is definable at a 3-mm slice thickness.

noted by observer 1 at a slice thickness of 1 mm ($n=28/31$, $p=0.0001$). Single fragments were more likely to be overlooked with larger slice thickness (2 mm: $n=21/31$; 3 mm: $n=18/31$). However, no significant differences regarding the number of detected fragments were detected in the results by observer 2 ($p=0.056$). Substantial differences were observed in the types of detected fragments (non-displaced/displaced) for each slice thickness. In 28 elbows, non-displaced fragments were predominantly detected at a slice thickness of 1 mm ($n=5/28$), 2 mm ($n=3/28$) and 3 mm ($n=3/18$). Therefore, non-displaced fragments were more likely to remain undetected at a slice thickness of 2 or 3 mm. However, this finding was not significant ($p=0.102$).

By observer 2, fissure lines were most frequently detected at a 1-mm slice thickness ($n=21/48$) and with decreasing frequency at 2-mm ($n=14/48$) and 3-mm slice thicknesses ($n=15/48$); although this finding was not significant ($p=0.0724$). These fissures primarily coursed the tip of the MCP ($n=4/7$) and the radial head ($n=3/7$). In particular, possible fissure lines were visible only in the 1-mm-thick slices ($n=3/28$) (► **Fig. 2**).

2) Imaging features indicating indirect evidence of MCD: For each observer, significant differences for MCD contour were observed between different slice thicknesses ($p=0.0001$). A sharp outline was more readily detected at a 1-mm slice thickness (observer 1: $n=51/56$; observer 2: $n=38/48$), whereas sharpness was decreased at a 2-mm slice thickness (observer 1: $n=22/56$; observer 2: $n=27/48$) and particularly at a 3-mm slice thickness (observer 1: $n=56/56$; observer 2: $n=42/48$).

The shape of the MCP did not differ significantly between different reconstructions. A highly significant difference was

noted between a reduced bone density and the subjective evaluation of sclerosis of the MCP ($p=0.0001$). Sclerosis of the MCP was most frequently noted at a 3-mm slice thickness ($n=42/48$) and at a focal location. Sclerosis of the humeral trochlea was less frequently noticed at slice thicknesses of 2 mm ($n=27/31$) and 3 mm ($n=22/36$) compared with 1 mm ($n=29/31$). The difference was significant when comparing 1-mm and 3-mm thick slices. Sclerosis of the radial head and radial incisure was rarely detected at any slice thickness. For observer 2, $n=43/56$ of cases showed hypoattenuation of the MCP at a 1-mm slice thickness and $n=37/56$ at a 2-mm slice thickness. However, observer 1 reported hypoattenuated bone in $n=41/56$ of cases at a 3-mm slice thickness ($p=0.0455$), compared with $n=33/56$ at a 1-mm slice thickness. Hypoattenuating bone lesions were almost exclusively evaluated with a focal distribution (1 mm: $n=34/34$; 2 mm: $n=34/34$; 3 mm: $n=33/37$).

Secondary osteoarthritic changes were recognized more frequently at a slice thickness of 3 mm; however, this difference was not significant ($p=0.871$). Interobserver disparity for MCP contour of the radial incisure was found. A smooth contour was determined most frequently at 3 mm (observer 1; $n=25/53$, $p=0.00321$) and 1 mm (observer 2; $n=13/15$, $p=0.00453$). An evaluation of kissing lesions revealed no significant differences between the slice thicknesses ($p=0.778$). However, kissing lesions were less frequently observed at the 3-mm slice thickness ($n=32/54$), compared with 1- and 2-mm slice thicknesses ($n=36/56$ for both observers).

Finally, the more experienced observer 2 found a consensus of 50% in an evaluation of 1-mm slices from a CT



Fig. 2 Transverse computed tomography images obtained at 1-, 2- and 3-mm slice thicknesses (from left to right) at the level of the medial coronoid process of the canine elbow. The 1-mm slice shows a well-delineated, thin, hypoattenuating fissure line (arrow) running through the tip of the medial coronoid process. The fissure becomes indistinct at 2 mm and is invisible at a 3-mm slice thickness.

examination with arthroscopic findings. Additionally, cases involving non-displaced fragments and/or fissure lines were more often detected with CT than with arthroscopy.

Discussion

To our knowledge, this is the first study to evaluate the influences of different CT slice thicknesses on the diagnostic reliability of CT features indicative of MCD in a clinical setting. Therefore, the present study contributes to and proves the necessity of at least 1-mm CT protocols, for reliable diagnosis of MCD. Notably, the study findings support our initial hypothesis that a slice thickness >2 mm would significantly reduce CT image quality, as a 1-mm slice thickness produced the highest quality images, characterized by a well-defined and sharp bony contour. The difference between these images and those obtained at greater thicknesses was significant.

Moreover, the findings of this study support the hypothesis that a slice thickness of ≥ 2 mm would result in false-negative diagnosis of MCD or fragmentation. Here, a 1-mm slice thickness yielded the highest detection rate of fragments, especially non-displaced and single fragments, and of fissures of the MCP; again, these differences were significant. Possible fissures were predominantly visible at the 1-mm slice thickness, and the risk of missing FCP lesions was greatest at the 3-mm slice thickness. The likelihood of detecting fragments at the 2-mm and 3-mm slice thicknesses increased with the number of fragments. This finding is possibly explained by the larger area occupied by multiple fragments.

The present study confirmed that CT slice thicknesses of 2 and 3 mm correlated proportionally with blurring of small bone structures, edges and contours, particularly in the narrow joint spaces of the elbow. A previous study reported the highest spatial resolution with a slice thickness of 1 mm.¹⁷ However, we note that the present study did not evaluate the effect of the slice thickness on conspicuity of MCP fragments of differing size. Other authors have reported that the presence of multiple fragments has been associated with a higher degree of osteophyte formation due to the advanced stage of the disease.¹⁶ Therefore, the reduced spatial resolution associated with an increased slice thickness could lead to the misinterpretation of osteophytes as MCP fragments and could contribute to an erroneous number of fragments in our study.

The interobserver discrepancies in the evaluation of secondary signs of MCD (reduced bone density, sclerosis, fissure lines and irregular radial incisures) may be attributed to subjectivity and differences in experience levels, as well as reduced image quality at slice thicknesses >2 mm. Differences in subjectivity among observers and the misinterpretation of stripe artefacts, appearing as hypoattenuating lines, have been discussed elsewhere.^{5,6} Notably, a previously published study of Tromblee and colleagues has reported the effects of the CT display window and image plane on specific regions of the elbow joint; here, the transverse plane provided the greatest diagnostic cer-

tainty for evaluations of the MCP and radial incisure, whereas the dorsal plane yielded the best diagnostic certainty for bone sclerosis and subchondral bone defects.¹⁸ The study also demonstrates the risk of misinterpretation of faint differences in attenuation in the MCP when evaluated subjectively.¹⁸ Objective bone density measurements using osteodensitometry or the use of visual grading scales may facilitate a more reliable evaluation of the trabecular bone density and reduce subjectivity.

In this study, no significant associations were observed between the slice thickness and the shape of the MCP or osteoarthritic changes.

The discrepancy between the findings of the 1 mm CT slices and arthroscopy was unexpected. In particular, the present study showed a greater detection rate of fissure lines and non-displaced fragments using CT. A recent study by Coppieters and colleagues compared CT and arthroscopic findings in canine elbow joints showing medial compartment syndrome and published comparable results. No significant agreement between the modalities concerning subchondral bone defects was found. Furthermore the presence of fragmentation of the MCP was not diagnosed consistently in all cases with arthroscopy but CT.¹⁹ This might be explained by the ability of detailed and non-overlapping visualization of the subchondral bone using CT.^{5,11,12} However, several previous studies have stated that arthroscopy is mainly limited by the inability to visualize subchondral bone covered by intact overlying cartilage.^{4,17,20} Moreover, arthroscopic visualization, especially of small fragments, is limited by the narrow joint space of the elbow.^{4,21} The results of the present study provide support of the existing literature suggesting the combination of CT and arthroscopy as the most adequate method for a complete evaluation of the MCP.⁵ However, this issue is beyond the scope of the present study and requires further investigation.

The current study was limited primarily by the subjective assessment of CT features by a small number of observers with different experience levels. In practice, observer 2 reported no difference in the detection of single fragments between the different CT slice thicknesses. This suggests that observer experience may play an important role in the evaluation of primary subchondral changes, particularly when using larger slice thicknesses. The results of the present study could have been improved by achieving consensus opinions about the CT features among a larger number of experienced observers. Furthermore, the statistical findings could have benefited from including a larger number of dogs. It also remains unclear whether the faint subchondral bone defects and hypoattenuating lines visible at a 1-mm CT slice thickness were overinterpreted as FCP lesions or not visible arthroscopically because of the intact overlying cartilage layer. The discrepancy between the CT and arthroscopic findings in the present study reflects a main limitation in literature reports, namely the lack of a gold standard for the evaluation of the canine elbow joint pertaining a diagnosis of MCD especially in dogs younger than 12 months. Previously, another research group reported that micro-CT would be an ideal reference modality for evaluating

the subchondral bone, especially in growing young dogs without clinical signs of lameness.⁵ We note, however, that micro-CT is considered an *in vitro* method. This shows a third limiting factor of our study: the population included only clinically lame adult dogs (older than 12 months) and no control group was introduced. Additional studies comparing CT slice thicknesses <1 mm with histologic findings in clinically lame and in healthy dogs would be beneficial to clarify the discrepancies between CT and arthroscopy. Furthermore, it would be interesting to evaluate whether the use of CT with a slice thickness of less than 1 mm is required to diagnose the early non-clinical stages of MCD and to determine the impact of image noise on the detectability of MCD.

The results of the present study are generalizable to other clinical settings because all clinical scanners can be used to achieve a 1-mm slice thickness. Furthermore, comparable results with other dog breeds of comparable size and weight are likely. Therefore, the dog breed and weight were not considered significant factors. However, we might assume that a higher resolution is needed for an exact assessment of the elbow in a smaller dog.

In summary, the current study demonstrates that a slice thickness of 1 mm is beneficial for the detection of fissure lines, possible fissure lines and non-displaced fragments in comparison to 2- and 3 mm. Therefore, we recommend the use of a slice thickness of ≤ 1 mm for the CT scans intended to assess MCD in the canine elbow. Additionally, these findings provide suggestions for a standardized CT protocol.

Note

Portions of this study were published as an abstract and presented at the 2015 Annual Scientific Meeting of the International Veterinary Radiology Association Meeting, Fremantle, Western Australia.

Authors' Contributions

All authors contributed to conception of study, study design, acquisition of data and data analysis and interpretation. All authors also drafted, revised and approved the submitted manuscript.

Funding

None.

Conflict of Interest

None declared.

Acknowledgments

Authors would like to thank Dr. Klaus Failing (K.F.), Marion Sparenberg, Dr. Christine Peppler (C.P.) for collaboration in the current study.

References

- Grøndalen J, Grøndalen T. Arthritis in the elbow joint of young rapidly growing dogs. V. A pathoanatomical investigation. Nord Vet Med 1981;33(01):1-16
- Temwichitr J, Leegwater PA, Hazewinkel HA. Fragmented coronoid process in the dog: a heritable disease. Vet J 2010;185(02):123-129
- Janutta V, Hamann H, Klein S, Tellhelm B, Distl O. Genetic analysis of three different classification protocols for the evaluation of elbow dysplasia in German shepherd dogs. J Small Anim Pract 2006;47(02):75-82
- Flückiger M. Ellbogendysplasie (ED) beim Hund [Elbow dysplasia in the dog]. Schweiz Arch Tierheilkd 1992;134(06):261-271 In German
- Villamonte-Chevalier A, van Bree H, Broeckx B, et al. Assessment of medial coronoid disease in 180 canine lame elbow joints: a sensitivity and specificity comparison of radiographic, computed tomographic and arthroscopic findings. BMC Vet Res 2015;11:243
- Moores AP, Benigni L, Lamb CR. Computed tomography versus arthroscopy for detection of canine elbow dysplasia lesions. Vet Surg 2008;37(04):390-398
- Danielson KC, Fitzpatrick N, Muir P, Manley PA. Histomorphometry of fragmented medial coronoid process in dogs: a comparison of affected and normal coronoid processes. Vet Surg 2006;35(06):501-509
- Carpenter LG, Schwarz PD, Lowry JE, Park RD, Steyn PF. Comparison of radiologic imaging techniques for diagnosis of fragmented medial coronoid process of the cubital joint in dogs. J Am Vet Med Assoc 1993;203(01):78-83
- Reichle JK, Snaps F. The elbow. Clin Tech Small Anim Pract 1999;14(03):177-186
- Lau SF, Theyse LF, Voorhout G, Hazewinkel HA. Radiographic, computed tomographic, and arthroscopic findings in Labrador Retrievers with medial coronoid disease. Vet Surg 2015;44(04):511-520
- Rau FC, Wigger A, Tellhelm B, et al. Observer variability and sensitivity of radiographic diagnosis of canine medial coronoid disease. Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere 2011;39:313-322. Cook CR, Cook JL. Diagnostic imaging in canine elbow dysplasia: a review. Vet Surg 2009;38:144-153
- Lau SF, Wolschrijn CF, Hazewinkel HA, Siebelt M, Voorhout G. The early development of medial coronoid disease in growing Labrador retrievers: radiographic, computed tomographic, necropsy and micro-computed tomographic findings. Vet J 2013;197(03):724-730
- Kunst CM, Pease AP, Nelson NC, Habing G, Ballegeer EA. Computed tomographic identification of dysplasia and progression of osteoarthritis in dog elbows previously assigned OFA grades 0 and 1. Vet Radiol Ultrasound 2014;55(05):511-520
- Goldman LW. Principles of CT: radiation dose and image quality. J Nucl Med Technol 2007;35(04):213-225, quiz 226-228
- Cook CR, Cook JL. Diagnostic imaging of canine elbow dysplasia: a review. Vet Surg 2009;38(02):144-153
- Walde I, Tellhelm B. Fragmented medial coronoid process of the ulna (FCP) and osteochondrosis dissecans (OCD) of the canine elbow-joint and hock-joint-literature-review, diagnosis and therapy. Wien Tierarztl Monatsschr 1991;78:414-424
- Groth AM, Benigni L, Moores AP, Lamb CR. Spectrum of computed tomographic findings in 58 canine elbows with fragmentation of the medial coronoid process. J Small Anim Pract 2009;50(01):15-22
- Tromblee TC, Jones JC, Bahr AM, Shires PK, Aref S. Effect of computed tomography display window and image plane on diagnostic certainty for characteristics of dysplastic elbow joints in dogs. Am J Vet Res 2007;68(08):858-871
- Coppieters E, Van Ryssen B, van Bree H, et al. Computed tomographic findings in canine elbows arthroscopically diagnosed with erosion of the medial compartment: an analytical method comparison study. Vet Radiol Ultrasound 2016;57(06):572-581
- Van Ryssen B, van Bree H. Arthroscopic findings in 100 dogs with elbow lameness. Vet Rec 1997;140(14):360-362
- Vermote KA, Bergenhuyzen AL, Gielen I, van Bree H, Duchateau L, Van Ryssen B. Elbow lameness in dogs of six years and older: arthroscopic and imaging findings of medial coronoid disease in 51 dogs. Vet Comp Orthop Traumatol 2010;23(01):43-50

Computed Tomography Enhances Diagnostic Accuracy in Challenging Medial Coronoid Disease Cases: An Imaging Study in Dog Breeding Appeal Cases

Jan Wennemuth¹ Bernd Tellhelm¹ Nele Eley¹ Kerstin von Pückler¹

¹ Department of Radiology, Justus-Liebig-Universität Gießen, Giessen, Germany

Vet Comp Orthop Traumatol 2020;33:356–362.

Address for correspondence Jan Wennemuth, DVM, Dr. med. vet., Fachtierarzt für Radiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, Frankfurter Straße 102, Giessen 35390, Germany (e-mail: Jan.Wennemuth@vetmed.uni-giessen.de).

Abstract

Objectives The aim of this study was to determine the radiographic sensitivity in detecting medial coronoid disease (MCD), using computed tomography (CT) as reference in dogs presented for an official second opinion, and to compare the medial coronoid process (MCP) in fragmented and fissured MCP as well as those unaffected by MCD.

Materials and Methods The data of dogs, presented for official second opinion radiographs and CT, were reviewed by three board-certified observers and in accordance with the International Elbow Working Group guidelines regarding MCD. Radiographic delineation, radiopacity and Hounsfield Units (HU) of the MCP were recorded additionally and the correlation between radiography and CT was investigated.

Results Sensitivity and specificity of radiography compared with CT yielded values of 83.6% for the former and 83.5% for the latter. False-negative grading in radiography correlated significantly ($p = 0.0001$) with a present fissure line in CT. The mean delineation ($p = 0.03$) and mean HU of fragmented MCP ($p = 0.0045$) were significantly reduced compared with fissured MCP and no significant differences in measured HU for fissured MCP were detected in comparison to elbows unaffected by MCD.

Conclusion The results of the present study show substantial agreement between radiography and CT in second opinion cases. However, sensitivity is reduced compared with not preselected cases. A present fissure line in CT was significantly associated with a false-negative grading in radiography. Therefore, CT imaging of the elbows is strongly recommended in cases of appeal.

Keywords

- ▶ canine
- ▶ elbow dysplasia
- ▶ medial coronoid disease
- ▶ CT
- ▶ fissures

Introduction

Elbow dysplasia is a heritable multi-factorial orthopaedic disease that commonly affects young large breed dogs and leads to osteoarthritis of the elbow joint.^{1,2} Medial coronoid disease is part of the elbow dysplasia pathology group and is deemed the most common cause of early onset osteoarthritis.³ The pathogenesis of medial coronoid disease has been dis-

cussed widely. Recent publications, however, demonstrated that medial coronoid disease develops as a result of disturbed endochondral ossification with retained hyaline cartilage and secondary development of fissures or fragmentation of the subchondral bone.^{4–7} Traditionally, radiographic screening methods have been used to examine the elbow joint.⁸ The lack of visibility regarding the proximal aspect of the medial coronoid process, reduced radiopacity, an altered shape, or

received
September 8, 2019
accepted after revision
May 31, 2020
published online
July 16, 2020

© 2020 Georg Thieme Verlag KG
Stuttgart · New York

DOI <https://doi.org/10.1055/s-0040-1714299>.
ISSN 0932-0814.

cortical irregularity, in addition to degenerative changes, is strongly indicative of medial coronoid disease.⁹ Computed tomography (CT) has been proven an excellent, non-invasive tool for the detection of medial coronoid disease with a high sensitivity and is recommended as the main imaging technique used to assess medial coronoid disease lesions.¹⁰ In addition to morphological alterations, changes in CT attenuation coefficient, measured in Hounsfield Units (HU) for medial coronoid disease affected joints, are also described.^{11,12}

To disqualify affected animals from breeding, the majority of European kennel clubs use screening programmes according to the protocol of the International Elbow Working Group (IEWG). The IEWG grading system is based on the analysis of radiographs. It differentiates elbow joints according to primary lesions and secondary osteoarthritis.¹³ The success of radiographic screening, in removing affected animals from the breeding pool, is limited to the sensitivity and specificity of the method. With 16 to 98%, the sensitivity of radiographic screening strongly depends on observer experience, screening method and patient age.^{10,14–18} In cases of ambiguous findings in the X-ray screening, owners are allowed to present their animals for official, second opinion radiographs. A CT study of the elbows is recommended but not mandatory in these cases.

The aim of this study was to determine the radiographic sensitivity detecting medial coronoid disease using CT as gold standard in a group of dogs presented for official second opinion radiographs and CT. A further aim was to assess the delineation, radiopacity and HU of the medial coronoid process in fragmented, fissured and normal medial coronoid processes. The authors expected a high prevalence of early stage disease in the population of appeal cases with only minimal changes. The hypothesis stated that fissures of the medial coronoid process, as an early stage of the disease, may not lead to changes in overall medial coronoid process HU and radiopacity or delineation and, therefore, may lead to false negative results in radiography.

Materials and Methods

Study Design

A prospective diagnostic accuracy design study was conducted. All canine patients that were presented for official second opinion radiographs and CT at the clinic for small animals of the Justus-Liebig-Universität Gießen in the period of 2010 to 2015, were included in the study, provided the medial coronoid process findings in the initial radiographs were questionable. Elbows with obvious findings in the initial grading (IEWG 3) were excluded. The Institutional Animal Care and Use Committee at the Justus-Liebig-Universität Gießen approved the study protocol.

Dogs were anaesthetized and then intubated for CT and radiographs, by administering a bolus of diazepam 0.2 mg/kg body weight (BW) (Diazepam-ratiopharm; 10 mg/2 mL, Ratiopharm GmbH, Ulm, Germany), ketamine 10 mg/kg BW (ketamine 10%, Medistar GmbH, Ascheberg, Germany) and xylazine 1 mg/kg BW (xylazine 20 mg, Medistar GmbH Ascheberg) intravenously. Anaesthesia was maintained with 1.5 to 2% isoflurane (isoflurane; CP Pharma, Burgdorf, Germany) in oxygen.

All patient information was removed from the images and an arbitrary number was assigned to each image, blinding the observers to the identity of the patient, as well as to the matching radiographic and CT study.

Three board certified observers (BT, NE, KVP) judged the radiographic and CT images for elbow dysplasia grade, according to the IEWG and reached a consensus for each image study. All observers were official scrutineers of the national screening programme according to IEWG guidelines with at least 10 years of working experience in the field of elbow dysplasia. The additional observer (JW, first year diagnostic imaging resident) measured the HU of the medial coronoid process area of interest in CT. The DICOM studies were analysed on a computer workstation using image analysis software (OsiriX MD 7.0; Pixmeo SARL, Rue de Bernex 266, 1233 Bernex, Suisse).

Radiography

Using a computed radiography system (Fuji CIR-102; YXLON International GmbH Essener Bogen 15, D-22419 Hamburg), crano-caudal, 15 degrees pronated and 90 degrees flexed mediolateral views were taken of each elbow, in accordance with the IEWG screening protocol. An additional 180 degrees mediolaterally extended position was investigated in German Shepherd dogs regarding the official guidelines of the kennel club.

Radiographic Grading

The radiographs were systematically assessed for medial coronoid disease and osteophytosis, according to the IEWG guidelines: Grade 0 = no evidence of medial coronoid disease, sclerosis or osteophytosis; grade borderline = minimal modelling in the anconeal process; grade 1 = elbows with osteophytosis <2 mm in size, and/or presence of sclerosis of the base of the medial coronoid process with visible trabecular pattern; grade 2 = elbows with osteophytosis 2–5 mm in size and/or obvious sclerosis and/or suspected medial coronoid disease; grade 3 = elbows with osteophytosis > 5 mm and/or obvious medial coronoid disease. Grade 0, borderline and grade 1 were considered free from medial coronoid disease and grades 2 to 3 were considered medial coronoid disease positive.

The subjective delineation and opacity of the medial coronoid process in radiography were recorded. For the delineation, observers were allowed to describe the medial coronoid process as sharply delineated (0), minimally delineated (1) or blurred (2). For the radiopacity, observers were able to decide between homogeneous radiopacity (0), minimal heterogeneous radiopacity (1) and substantial heterogeneous radiopacity (2).

Computed Tomography

Computed tomography scans were performed using a 16-slice helical CT scanner (Brilliance TM CT 16, Philips Medical Systems, Röntgenstraße 24, D-22335 Hamburg), 140 kVp, 104 mAs and 25 cm field of view parameters. The dogs were positioned in sternal recumbency, with one forelimb extended cranially. Each elbow was scanned individually. To avoid artifacts, the head and neck were bent laterally to keep them out of the scan field of view. Transverse images with

1 mm slice thickness and 0.6 mm increment were obtained of the elbow, including 5 cm proximal and distal to the joint.

Computed Tomographic Grading

Computed tomography studies were systematically assessed for medial coronoid disease and degenerative changes. There existed no official IEWG guideline, for the CT examination of the elbow joint, at the time of the study. Grading was based on the previously discussed IEWG radiography guidelines.¹³ Elbows with fissure lines were scored grade 2, whereas elbows with a fragment were scored grade 3. A joint was graded as 'fissured' if there was a hypoattenuating line visible in the tip of the medial coronoid process that showed a blind ending. A medial coronoid process was called 'fragmented' if there was a complete line of separation visible between the fragment and the base.

Measuring of Hounsfield Units

For HU measurements, CT studies were reviewed in transverse planes. Partial density was measured using a polygonal area measuring tool of the image analysis software (OsiriX MD 7.0, Pixmeo SARL). To standardize the collected data, a straight line was positioned along the cranial part of the proximal radioulnar joint, in the first proximal slice, which allows complete visibility of the medial coronoid process. A second line was placed as a tangent along the tip of the medial coronoid process crossing the first line at a right angle. Parallel to the tangent, a third straight line was placed 6 mm caudal to the tangent across the medial coronoid process. The area of the medial coronoid process between these two lines was measured with the polygonal area tool (►Fig. 1). The same technique was repeated in the two consecutive, more distal slices. In the second slice, a distance of 5 mm was used between the tangent and its parallel line across the medial coronoid process. In the third slice, respectively, a distance of 4 mm was used. The size of each drawn area in mm² and mean attenuation in HU were recorded. The mean attenuation of the entire area was calculated taking the size of each area into account.

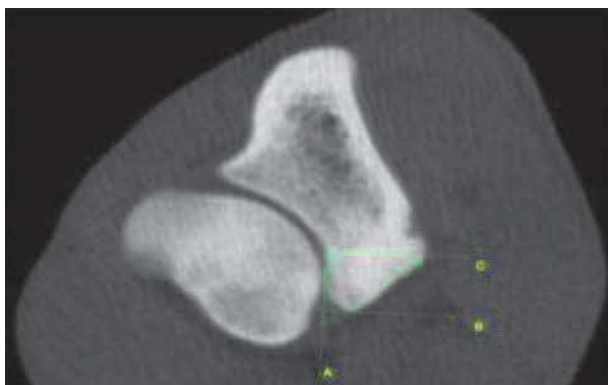


Fig. 1 Elbow joint in transverse plane at the level of the medial coronoid process. Note the lines positioned for the Hounsfield units measurements. The straight line is aligned along the cranial part of the proximal radioulnar joint (A); the other lines are crossing the first line in a right angle at the tip of the medial coronoid process (B and C) and 6 mm caudal to the tip.

Statistical Analysis

Statistical analyses were conducted by a university employed statistician with the commercially available software (BMDP Statistical Software, Inc. Statistical Solutions Ltd. Ireland). Sensitivity and specificity were calculated for radiography compared with CT as the gold standard. Cohen's Kappa coefficient was used to calculate the concordance. Based on the results of the comparison between the radiographic grading and the CT grading, the false positives (IEWG in radiography grade 2 or 3 and CT grade 0, borderline or 1) and false negatives (IEWG radiography grade 0, 1 or borderline and CT grade 2 or 3) were extracted. The measured HU values, the subjective delineation and subjective radiopacity were compared between different IEWG grades. The statistical association between a false positive or false negative grading in radiography and the subjective delineation and subjective radiopacity was calculated using Spearman's rank correlation coefficient (r_s). For false negative grading, additionally the association with the presence of a fissure (CT grade 2) or a fragment (CT grade 3) was calculated with Fisher's exact test. Spearman's rank correlation coefficient was used to calculate the statistical dependence between the IEWG grading and the subjective delineation and radiopacity. To assess the statistical association in measured HU regarding different grades, subjective delineation and subjective radiopacity, single factor variance analyses were calculated. Qualitative data are presented as count numbers or percentages. Quantitative data are presented as means with standard deviation (SD) in data with normal distribution and medians with range in non-normally distributed data. A p -value of < 0.05 was considered significant.

Results

Radiographic and Computed Tomography Grading

A total of 70 dogs met the inclusion criteria. None of these dogs had a history of prior lameness or previously known orthopaedic diseases. Of these, 32 were females and 38 males with a median age of 14.8 months ranging from 11.7 to 67.3 months and an average body weight of 30.81 kg BW with a SD of 5.07 kg BW. Seven breeds were included: Golden Retrievers (24), German Shepherds (23), Labrador Retrievers (17), Rottweilers (3), an Airedale Terrier, a Bernese Mountain dog and a Chesapeake Bay Retriever.

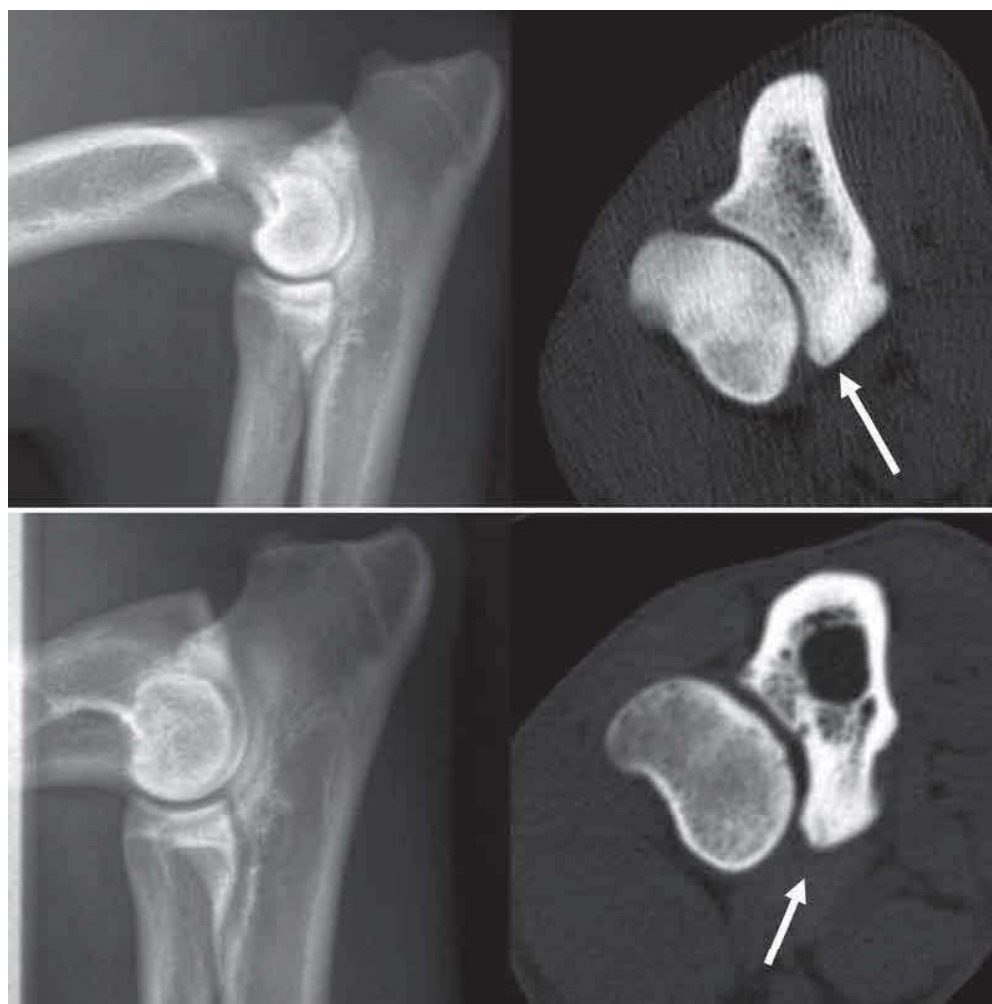
A total number of 140 elbow joints were examined. The results are listed in ►Table 1.

In 117/140 of the dogs, the presence or absence of medial coronoid disease was confirmed on both radiographs and CT scans. In 13/140 cases, there was a false positive suspicion regarding medial coronoid disease in radiography and in 10/140 cases there was a false negative suspicion (►Fig. 2).

Sensitivity and specificity of radiography compared with CT yielded values of 83.6% for the former and 83.5% for the latter, with a diagnostic accuracy of 83.6%. The methods showed substantial agreement ($\kappa = 0.67$). False negative grading in radiography correlated significantly ($p = 0.0001$) with a present fissure line and no significant correlation for false positive grading was detected.

Table 1 Grading of elbows in radiography and computed tomography according to the International Elbow Working Group Guidelines

	Grade 0	Grade borderline	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Total number of elbows
Radiography	52	16	8	58	6	140
Computed tomography	34	21	24	23	38	140

**Fig. 2** Two elbow joints in 90 degrees flexed mediolateral view and corresponding computed tomography (CT) images in transversal plane at the level of the medial coronoid process. The elbows were graded 'normal' in radiography and as 'fissured' in CT. Both joints showed minimal heterogeneous radiopacity and minimal delineation in radiography. Note the hypoattenuating lines at the tip of the medial coronoid process (arrows).**Radiographic Delineation and Radiopacity**

In 41 elbows, the medial coronoid process was described as sharply delineated. In 60 elbows, it was minimally delineated and in 39 elbows it was blurred. Between the radiographic delineation and the IEWG grading system, a significant correlation was shown in radiography ($p < 0.0001$; $r_s = -0.4836$) and CT ($p < 0.0001$; $r_s = -0.4099$).

Forty-seven elbows showed a homogeneous radiopacity, whereas 53 were minimally heterogeneous and 40 displayed marked heterogeneity. Again, a significant correlation was shown, between the radiopacity and the IEWG grading

system, in radiography ($p \leq 0.0001$; $r_s = -0.5758$) and CT ($p \leq 0.0001$; $r_s = 0.5918$).

Significant differences ($p \leq 0.0001$) were also found in the subjective delineation and radiopacity of elbows without medial coronoid disease (mean value delineation 0.57; mean value radiopacity 0.52), fissured (mean value delineation 1.31; mean value radiopacity 1.36) or fragmented medial coronoid processes (mean value delineation 1.64; mean value radiopacity 1.59). The mean delineation of fragmented medial coronoid processes was significantly reduced compared with fissured medial coronoid processes ($p = 0.03$).

Table 2 Comparison of measurements of Hounsfield units (HU) for elbows without medial coronoid disease (grade 0, borderline and grade 1), elbows with a fissure (grade 2) and elbows with a fragment (grade 3)

	Elbows without medial coronoid disease	Elbows with a fissure	Elbows with a fragment
Measured density in HU (mean \pm standard deviation)	1287.63 \pm 154.99	1281.49 \pm 145.59	1120.31 \pm 191.92
Number of elbows	79	23	38

The mean radiopacity of fragmented medial coronoid processes was not significantly reduced compared with fissured medial coronoid processes ($p = 0.08$).

Measurements of Hounsfield Units

The mean measured HU values and SD are listed in **Table 2**. In elbows with a fragment, a significantly reduced ($p = 0.0001$) attenuation was detected in comparison to medial coronoid disease-free elbows. The medial coronoid processes with a fragment showed a significant difference ($p = 0.0045$) in measured HU compared with medial coronoid processes with a fissure. The latter, however, showed no significant difference compared with medial coronoid disease-free elbows.

The average measured density of the medial coronoid process showed a significant, negative correlation with the subjective delineation ($p = 0.0001$; $r_s = -0.3238$) and radiopacity ($p = 0.0003$; $r_s = -0.3047$).

Discussion

Sensitivity and Specificity of Detection

In the present study, a radiographic sensitivity of 83.6% for the detection of medial coronoid disease using CT as gold standard in a group of dogs presented for official second opinion radiographs and CT was determined.

This value is lower compared with studies where the grading was performed similarly and in accordance with the IEWG guidelines. These studies report a notably high radiographic sensitivity of 96.7 to 98%^{10,16} for the detection of medial coronoid disease. There are different explanations for the slightly lower sensitivity in the present study. The observers consider it likely that the pre-selection of appeal cases, with a high rate of fissures in the study population, lead to an increased number of false positives and false negatives. Additionally, the study population of the previously named studies^{10,16} consisted only of clinically lame patients. We assume that the incidence of severe pathologic changes is higher in lame patients compared with patients presented for radiographic screening. Another possibility is that the decreased sensitivity is observer related. This is considered unlikely as all of the observers were board certified in veterinary diagnostic imaging and experienced observers of dog breeding elbow dysplasia screening programmes. A further explanation could be that findings were over-interpreted in previous studies because the specificity of detection was lower with 69 and 74%^{10,16} compared with 83.5% in the present study. Additionally, it must be taken into account that a group of three observers may grade differently

compared with a single person and that the consensus decision influences the sensitivity and specificity.

The achieved sensitivity for the detection of medial coronoid disease in the current study is, however, higher compared with previous reports where the decision, whether an elbow is affected or not, was based primarily on osteophytosis or the visibility of fragments and the sensitivity ranged between 10 and 62%.^{15,17,19} This approach generally results in a decreased sensitivity but high specificity.²⁰ In the present study, the lack of delineation or reduced radiopacity of the proximal segment of the medial coronoid process was taken into account in accordance with IEWG guidelines. This may lead to increased sensitivity, although the specificity in our study was still high with 83.5%.

Radiographic screening, according to the IEWG guidelines, has been proven as a successful tool to decrease the incidence of elbow dysplasia in the past, with a high sensitivity for the detection of medial coronoid disease in the normal breeding population.^{16,21} It is widely available and reduces the economic strain on dog owners compared with CT.

We proved our hypothesis that fissures of the medial coronoid process did not lead to substantial changes in overall medial coronoid process HU and radiopacity or delineation and, therefore, may lead to false negative results in radiography. This suggests that CT adds valuable information especially in cases with questionable pathologic findings in radiography and should be mandatory in official second opinion cases as we found an increased number of false negative and false positive graded joints in the population of appeal cases.

Radiographic Delineation, Radiopacity and Measurements of HU

In the present study, the observers detected a significantly reduced ($p \leq 0.0001$) delineation and radiopacity of the medial coronoid process in medial coronoid disease positive animals compared with animals that were not affected, as described previously.^{14,17} Reduced bone density is a consequence of the pathological modelling of the subchondral bone in animals affected by medial coronoid disease. Disturbed endochondral ossification, in the calcifying zone of articular cartilage of animals affected by medial coronoid disease, results in weaker points between retained hyaline cartilage and subchondral bone.⁷ Recurring, weight-related strain leads to microfractures of the bone.²²⁻²⁴ This normally induces physiological bone remodelling processes, with osteoclasts removing destroyed material and osteocytic new bone proliferation.²⁵⁻²⁹ Physiological adaptive bone remodelling fails in medial coronoid disease and reduced

osteocyte density, osteonecrosis and micro-fractures are histologically detectable.^{4,5,30} Subsequently, macroscopic avascular fragments may develop.

In the present study, a significant decrease ($p = 0.0001$) was also found in the mean HU density of elbows with a fragment compared with elbows that were not affected in CT. These results are consistent with our radiographic results but diverge from those of previously published CT studies.^{8,12} A possible explanation could be that, in the current study, only the tip of the medial coronoid process was investigated to avoid inclusion of the presumed sclerotic base leading to a falsely increased density measurement.

Elbows with a fissure line showed a better delineation and increased radiopacity compared with elbows with a fragment, although these results were only significant for the delineation ($p = 0.03$) and not for the radiopacity ($p = 0.08$). The mean density HU for fissured medial coronoid processes was found to be significantly higher ($p = 0.0045$) in the present study compared with fragmented medial coronoid processes and we found a significant correlation for a false negative grading in radiography. Six out of ten false negatives showed a fissure line of the medial coronoid process in CT, compared with 16 out of 95 other elbows. These findings support the assumption that fissure lines are an early stage of disease, with only minimal modelling and loss of bone density. It appears reasonable that this might be the major reason for a false negative grading of fissures in radiography.

There are several limitations to this study. The observers used CT as gold standard for the detection of medial coronoid disease. Traditionally, arthroscopy is considered the gold standard for the detection of medial coronoid disease.^{31,32} The detection of purely cartilaginous lesions may fail; therefore, CT has a sensitivity of 71 to 100% compared with arthroscopy.^{10,16,17,31} On the other hand, arthroscopy is limited to the examination of the superficial articular cartilage. Lesions within deeper layers or subchondral bone may be missed.^{10,31} In one histopathological study, the pathological findings were located primarily in the subchondral bone and not in the articular cartilage of the medial coronoid process.³⁰ Additionally, large microcracks in the trabecular bone without overt abnormalities in the overlying articular cartilage have also been reported in a morphologic study of the medial coronoid process.⁴ Thus, in recent publications authors have recommended CT as the main imaging technique or a combination of CT and arthroscopy to assess medial coronoid disease lesions.^{10,31} As CT and arthroscopy provide complementary information regarding the articular cartilage and the subchondral bone, also the definition of a fissure is somewhat different depending on the modality. In arthroscopy, fissures are defined by full-thickness cartilage lesions without movement of the bone during palpation,¹⁴ whereas in CT a fissure is defined as an incomplete fracture line within the subchondral bone of the medial coronoid.³⁰ Presence or absence of a fissure was judged based on CT exclusively in this study. It is yet to determine whether the CT findings equal histopathologic changes of the medial coronoid process. Theoretically, there is a chance that vascular channels were mistaken for fissure lines within the medial

coronoid process, or that the morphologic differentiation of a 'fissured' or 'fragmented' medial coronoid process is not reflecting the histopathologic changes entirely. Further investigation into this field is needed to prove these results.

Another drawback of the study is that the observers used the IEWG guidelines to grade the elbow joints and considered grade 0, borderline and 1 as free from medial coronoid disease. Borderline and grade 1 elbows show osteophytes <2 mm or a mild sclerosis and it cannot be ruled out that these animals will potentially develop a medial coronoid disease at a later point in time. However, the majority of animals affected already shows evident primary lesions at the age of 12 months.^{1,2}

In conclusion, the results of the present study show substantial agreement between radiography and CT grading in official second opinion cases. However, the radiographic sensitivity is reduced compared with previous studies using the IEWG guidelines and not preselected cases. Significant differences were detected in delineation and mean measured HU for fissured and fragmented medial coronoid processes and a present fissure line in CT was significantly associated with a false negative grading in radiography. Therefore, CT imaging of the elbows is recommended for questionable second opinion cases, as a high prevalence of fissures can be expected, and these may be missed by radiography.

Authors' Contributions

All authors contributed to the study concept, design, data acquisition, analysis and interpretation. All authors drafted, revised and approved the submitted manuscript.

Conflict of Interest

None declared.

Funding

This project was funded by the Justus-Liebig-Universität Gießen.

References

- 1 Kirberger RM, Fourie SL. Elbow dysplasia in the dog: pathophysiology, diagnosis and control. *J S Afr Vet Assoc* 1998;69(02):43–54
- 2 Morgan JP, Wind A, Davidson AP. Bone dysplasias in the Labrador retriever: a radiographic study. *J Am Anim Hosp Assoc* 1999;35(04):332–340
- 3 Grøndalen J, Grøndalen T. Arthrosis in the elbow joint of young rapidly growing dogs. V. A pathoanatomical investigation. *Nord Vet Med* 1981;33(01):1–16
- 4 Danielson KC, Fitzpatrick N, Muir P, Manley PA. Histomorphometry of fragmented medial coronoid process in dogs: a comparison of affected and normal coronoid processes. *Vet Surg* 2006;35(06):501–509
- 5 Lau SF, Wolschrijn CF, Hazewinkel HA, Siebelt M, Voorhout G. The early development of medial coronoid disease in growing Labrador retrievers: radiographic, computed tomographic, necropsy and micro-computed tomographic findings. *Vet J* 2013;197(03):724–730
- 6 Temwichitr J, Leegwater PA, Hazewinkel HA. Fragmented coronoid process in the dog: a heritable disease. *Vet J* 2010;185(02):123–129
- 7 Lau SF, Hazewinkel HA, Grinwis GC, et al. Delayed endochondral ossification in early medial coronoid disease (MCD): a morphological and immunohistochemical evaluation in growing Labrador retrievers. *Vet J* 2013;197(03):731–738

- 8 Cook CR, Cook JL. Diagnostic imaging of canine elbow dysplasia: a review. *Vet Surg* 2009;38(02):144–153
- 9 Hornof WJ, Wind AP, Wallack ST, Schulz KS. Canine elbow dysplasia. The early radiographic detection of fragmentation of the coronoid process. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2000;30(02):257–266, v
- 10 Villamonte-Chevalier A, van Bree H, Broeckx B, et al. Assessment of medial coronoid disease in 180 canine lame elbow joints: a sensitivity and specificity comparison of radiographic, computed tomographic and arthroscopic findings. *BMC Vet Res* 2015;11(01):243
- 11 Villamonte-Chevalier A, Dingemans W, Broeckx BJ, et al. Bone density of elbow joints in Labrador retrievers and Golden retrievers: comparison of healthy joints and joints with medial coronoid disease. *Vet J* 2016;216:1–7
- 12 Klumpp S, Karpenstein H, Tellhelm B. Die computertomographische Morphologie und Anatomie des Ellbogengelenkes mit Schwerpunkt des Processus coronoideus medialis ulnae bei mit ED = 0 beurteilten Hunden spezieller Rassen. *Kleintierpraxis* 2013;2:57–64
- 13 Ondreka N. Explanation of grading according to IEWG and discussion of cases. Proceedings 29th annual meeting IEWG. Bangkok Thailand, May 17, 2015:38–39
- 14 Fitzpatrick N, Smith TJ, Evans RB, Yeadon R. Radiographic and arthroscopic findings in the elbow joints of 263 dogs with medial coronoid disease. *Vet Surg* 2009;38(02):213–223
- 15 Haudiquet PR, Marcellin-Little DJ, Stebbins ME. Use of the distomedial-proximolateral oblique radiographic view of the elbow joint for examination of the medial coronoid process in dogs. *Am J Vet Res* 2002;63(07):1000–1005
- 16 Rau FC, Wigger A, Tellhelm B, et al. Observer variability and sensitivity of radiographic diagnosis of canine medial coronoid disease. *Tierarztl Prax Ausg K Klientiere Heimtiere* 2011;39(05):313–322
- 17 Carpenter LG, Schwarz PD, Lowry JE, Park RD, Steyn PF. Comparison of radiologic imaging techniques for diagnosis of fragmented medial coronoid process of the cubital joint in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1993;203(01):78–83
- 18 Lau SF, Theyse LF, Voorhout G, Hazewinkel HA. Radiographic, computed tomographic, and arthroscopic findings in Labrador retrievers with medial coronoid disease. *Vet Surg* 2015;44(04):511–520
- 19 Wosar MA, Lewis DD, Neuwirth L, et al. Radiographic evaluation of elbow joints before and after surgery in dogs with possible fragmented medial coronoid process. *J Am Vet Med Assoc* 1999;214(01):52–58
- 20 Lappalainen AK, Mölsä S, Liman A, Snellman M, Laitinen-Vapaa-vuori O. Evaluation of accuracy of the Finnish elbow dysplasia screening protocol in Labrador retrievers. *J Small Anim Pract* 2013;54(04):195–200
- 21 Janutta V, Hamann H, Klein S, Tellhelm B, Distl O. Genetic analysis of three different classification protocols for the evaluation of elbow dysplasia in German shepherd dogs. *J Small Anim Pract* 2006;47(02):75–82
- 22 Schaffler MB, Radin EL, Burr DB. Mechanical and morphological effects of strain rate on fatigue of compact bone. *Bone* 1989;10(03):207–214
- 23 Danova NA, Colopy SA, Radtke CL, et al. Degradation of bone structural properties by accumulation and coalescence of micro-cracks. *Bone* 2003;33(02):197–205
- 24 Tami AE, Nasser P, Schaffler MB, Knothe Tate ML. Noninvasive fatigue fracture model of the rat ulna. *J Orthop Res* 2003;21(06):1018–1024
- 25 Bentolila V, Boyce TM, Fyhrie DP, Drumb R, Skerry TM, Schaffler MB. Intracortical remodeling in adult rat long bones after fatigue loading. *Bone* 1998;23(03):275–281
- 26 Burr DB. Targeted and nontargeted remodeling. *Bone* 2002;30(01):2–4
- 27 Colopy SA, Benz-Dean J, Barrett JG, et al. Response of the osteocyte syncytium adjacent to and distant from linear micro-cracks during adaptation to cyclic fatigue loading. *Bone* 2004;35(04):881–891
- 28 Cardoso L, Herman BC, Verborgt O, Laudier D, Majeska RJ, Schaffler MB. Osteocyte apoptosis controls activation of intracortical resorption in response to bone fatigue. *J Bone Miner Res* 2009;24(04):597–605
- 29 Verborgt O, Gibson GJ, Schaffler MB. Loss of osteocyte integrity in association with microdamage and bone remodeling after fatigue in vivo. *J Bone Miner Res* 2000;15(01):60–67
- 30 Mariee IC, Gröne A, Theyse LF. The role of osteonecrosis in canine coronoid dysplasia: arthroscopic and histopathological findings. *Vet J* 2014;200(03):382–386
- 31 Moores AP, Benigni L, Lamb CR. Computed tomography versus arthroscopy for detection of canine elbow dysplasia lesions. *Vet Surg* 2008;37(04):390–398
- 32 Oakley SP, Portek I, Szomor Z, et al. Arthroscopy – a potential “gold standard” for the diagnosis of the chondropathy of early osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13(05):368–378

Computertomografische Morphologie des Ellbogengelenks und Vorkommen der Ellbogengelenkdysplasie beim Rotfuchs (*Vulpes vulpes*)

Computed tomography based elbow joint morphology and incidence of elbow dysplasia in the red fox (*Vulpes vulpes*)

Autoren

Lena M. Holbein¹, Kerstin H. von Pückler¹, Martin Kramer¹, Klaus Failing², Markus Kirsch³

Institute

- 1 Klinik für Kleintiere (Chirurgie) der Justus-Liebig-Universität Gießen
- 2 AG Biomathematik und Datenverarbeitung, Fachbereich 10 der Justus-Liebig-Universität Gießen
- 3 Tierärztliche Klinik für Pferde Warendorf-Milte

Schlüsselwörter

Anatomie, Ellbogen, Entwicklungsstörung, Processus coronoideus medialis ulnae, ED, CT

Key words

Anatomy, elbow joint, developmental disease, medial coronoid process, ED, CT

eingereicht 17.10.2019

akzeptiert 31.03.2020

Bibliografie

DOI <https://doi.org/10.1055/a-1162-1273>

Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere 2020; 48: 176–185

© Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York

ISSN 1434–1239

Korrespondenzadresse

Lena Maria Holbein

Klinik für Kleintiere (Chirurgie)

Justus-Liebig-Universität Gießen

Frankfurter Straße 108

35392 Gießen

lena.m.holbein@vetmed.uni-giessen.de

ZUSAMMENFASSUNG

Gegenstand und Ziel Die Ellbogengelenkdysplasie (ED) ist eine genetisch bedingte Entwicklungsstörung des kaninen Ellbogengelenks und eine häufige Lahmheitsursache der Vordergliedmaße des Haushundes (*Canis lupus familiaris*). Sie tritt überwiegend bei großen und mittelgroßen Rassehunden auf, wurde aber auch bei Mischlingshunden und Hunden kleinerer Rassen beschrieben. Angaben zu einem Vorkommen der ED bei Wildtieren fehlen in der Literatur. Ziel dieser Studie war, einen Überblick über die Anatomie des Ellbogengelenks des

Rotfuchses (*Vulpes vulpes*) und das Vorkommen der ED bei dieser Spezies zu erlangen. Die spezielle Konformation des Ellbogengelenks beim Rotfuchs kann im direkten Vergleich mit der unserer Haushunde dabei helfen, mehr Erkenntnisse über den Einfluss der Anatomie auf die Entwicklung der ED zu gewinnen.

Material und Methoden Insgesamt 94 Ellbogengelenke von 49 Rotfüchsen wurden computertomografisch untersucht und mit kaninen Ellbogengelenken verglichen.

Ergebnisse Abgesehen von der Größendifferenz sowie geringgradigen artspezifischen Unterschieden zeigte sich eine große Ähnlichkeit der anatomischen Strukturen der Ellbogengelenke der Rotfüchse und Haushunde. Überproportional häufig wurde beim Rotfuchs eine runde Konformation des Koronoids festgestellt. Zwei Ellbogengelenke von 2 Rotfüchsen wiesen pathologische Veränderungen des Processus coronoideus medialis ulnae auf.

Schlussfolgerung Die mit 2,1 % ermittelte Prävalenz pathologischer Veränderungen des Koronoids beim Rotfuchs ist vergleichbar mit der Prävalenz der ED bei kleinen Hunderassen. Das überproportional häufige Auftreten der runden Konformation des Koronoids beim Rotfuchs führt zu der Hypothese, dass die runde Konformation die physiologische und ursprüngliche Konformation sein könnte. Selektives Züchten auf solch ein morphologisches Merkmal kann ein Ansatz sein, die Verbreitung der ED zu verringern.

Klinische Relevanz Der Einfluss der Anatomie auf die Entstehung pathologischer Veränderungen des Koronoids ist weiterhin unklar, sodass der Fokus bei der Suche nach der Ätiopathogenese, neben der Berücksichtigung der Anatomie des Ellbogengelenks, auf weiteren Faktoren (z. B. die Biomechanik, Genetik und Umweltfaktoren) liegen muss.

ABSTRACT

Objective Elbow dysplasia (ED) is a common developmental disease of the canine elbow joint and one of the most frequent causes of forelimb lameness in domestic dogs (*Canis lupus familiaris*). ED is predominantly present in medium to large breed dogs, but has also been described in mixed breed dogs and smaller breeds. In the literature, no information is available concerning the existence of ED in wildlife species. The purpose of the present study was to obtain an overview of the elbow

joint anatomy of the red fox as well as to demonstrate the incidence of ED in red foxes. Knowledge regarding the elbow conformation in red foxes may help to understand the effect of anatomical difference onto the pathogenesis of developmental elbow disease.

Material and methods A total 94 elbow joints of 49 red foxes (*Vulpes vulpes*) were evaluated using computed tomography (CT) and were compared to canine elbow joints.

Results Apart from size differences and minor species-specific variations, the anatomy of the elbow joints of red foxes and domestic dogs proved to be very similar. In the red foxes, the rounded conformation of the medial coronoid process was shown to be present in 76% of the individuals. Two elbow joints in 2 red foxes exhibited pathological changes of the medial coronoid process in the CT imaging.

Conclusion The prevalence of medial coronoid disease in red foxes amounted to 2.1% in the presented population. This observation is comparable to the prevalence of elbow dysplasia in small breed dogs. The rounded conformation of the medial coronoid process was found in more than three-quarters of the examined red foxes. This leads to the hypothesis that this conformation of the medial coronoid process could be the original, physiological variant. Selective breeding for such a morphological feature may be an approach to reduce the frequency of canine elbow dysplasia.

Clinical relevance The significance of anatomical characteristics in the development of elbow dysplasia is still unknown. Therefore, research concerning the pathogenesis of medial coronoid disease should set its focus not only on elbow joint anatomy, but also on other influencing factors, such as biomechanics, genetics and environmental parameters.

Einleitung

Der Rotfuchs (*Vulpes vulpes*) wird, ebenso wie der Haushund (*Canis lupus familiaris*), der Familie der Hundeartigen (Canidae) zugeordnet. Gemeinsame Merkmale der Canidae sind beispielsweise das aus 42 Zähnen bestehende Permanentgebiss sowie das Vorliegen von mindestens 4 vollständig ausgebildeten Zehen an den Vorder- und Hintergliedmaßen [16]. Das Skelett des Rotfuchses und das Skelett eines kleinen, schlanken Haushundes ähneln sich grundsätzlich sehr [19]. Mit einer maximalen Körpermasse von 14 kg und einer Körperlänge von bis zu 90 cm ist der Rotfuchs jedoch leichter und wendiger als die meisten Haushunde [19][32]. Über anatomische Charakteristika sowie spezifische Merkmale des Skeletts des Rotfuchses ist in der Literatur trotz der ubiquitären Verbreitung dieser Spezies in Deutschland und der gesamten Nordhalbkugel kaum etwas bekannt [19][44]. Auch über Pathologien des Skelettsystems des Rotfuchses gibt es nur wenige Berichte.

Die Ellbogengelenkdysplasie (ED) stellt eine bedeutende Skeletterkrankung des Haushundes dar [9]. Unter diesem Begriff wird nach der International Elbow Working Group (IEWG) die Arthrosebildung im Ellbogengelenk durch einen fragmentierten Processus coronoideus medialis ulnae (PCMU), einen isolierten Processus anconaeus, das Vorliegen einer Osteochondrosis dissecans, Gelenknorpelerosionen und Gelenkinkongruenz verstanden [17]. Beim Haushund ist die ED mit vereinzelt berichteten Prävalenzen von über 50% weit verbreitet und die häufigste Lahmheitsursache der Vordergliedmaße bei großen und mittelgroßen Tieren [30][36]. In geringerer Zahl wird die ED bei chondrodystrophen Rassen wie Französischer Bulldogge, Mischlingshunden und kleineren Hundrassen wie Dackeln oder Shelties beschrieben [5][20][30][31][41][42]. Bei Hauskatzen (*Felis catus*) ist bisher kein veröffentlichter Fall einer ED bekannt [14][22].

Trotz intensiver Forschung zur Entstehung der ED sind die genauen Pathomechanismen dieser genetisch bedingten Erkrankung noch kaum verstanden [15]. Nach aktuellen Studien sind für die Vererbung der ED wenige Hauptgene verantwortlich [11][20][34]. Deshalb ist es besonders wichtig, das Vorkommen der ED durch selektives Züchten zu verringern. Zur Zuchtuntersuchung und bei der

Diagnostik klinischer Fälle werden die Ellbogengelenke radiologisch und gegebenenfalls computertomografisch untersucht. Durch die überlagerungsfreie Darstellung aller Strukturen des Ellbogengelenks ist die computertomografische Untersuchung der Röntgendiagnostik überlegen [4][24][43]. Zahlreiche Studien haben sich mit den morphologischen computertomografischen Befunden des unauffälligen wie auch des durch die ED veränderten Ellbogengelenks des Haushundes beschäftigt. Im Fokus standen hierbei vor allem die Form des PCMU sowie die Fläche und Dichteverteilung innerhalb des Ellbogengelenks [6][10][18][21][25][33][38]. Die Ellbogengelenke von verwandten Wildtieren, wie z. B. dem Wolf (*Canis lupus*) oder dem Rotfuchs, wurden bisher nicht in die Forschung einbezogen. Das Ziel der vorliegenden Studie war daher zunächst, CT-anatomische Normalbefunde des Ellbogengelenks des Rotfuchses darzustellen und das Vorkommen der ED beim Rotfuchs zu analysieren. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf der Beschreibung der physiologischen Form sowie der Dichte und Fläche des PCMU. Im zweiten Schritt wurden die Befunde der Ellbogengelenke der Rotfüchse mit denen gesunder Haushunde verglichen mit dem Ziel, weitere Erkenntnisse zur Entstehung der ED zu erlangen.

Material und Methoden

Tiere

Die Studie umfasst die computertomografische Beurteilung von 94 Ellbogengelenken von 49 verstorbenen Rotfüchsen. Die untersuchten Fuchskadaver aus 4 Regionen Deutschlands (Mittelhessen, Eifel, Niederrhein, Paderborner Land) wiesen überwiegend eine Körpermasse zwischen 6 und 7 kg auf.

Computertomografische Untersuchung und Bildauswertung

Die CT-Untersuchung der Ellbogengelenke erfolgte mit einem 16-Zeilen-Spiral-CT der Firma Phillips (Brilliance TM CT 16-Slice, Amsterdam, Niederlande). Der Tierkörper befand sich in Brust-Bauch-Lage mit gestreckten Vordergliedmaßen in neutraler Position in Richtung der Gantry. Der Kopf wurde zur Vermeidung



► **Abb. 1** Lagerung der Fuchskadaver im CT in Brust-Bauch-Lage mit gestreckten Vordergliedmaßen in neutraler Position in Richtung der Gantry. Beide Ellbogengelenke wurden gleichzeitig untersucht. Der Kopf wurde zur Seite gebeugt, um Aufhärungsartefakte zu vermeiden. Quelle: © L. M. Holbein.

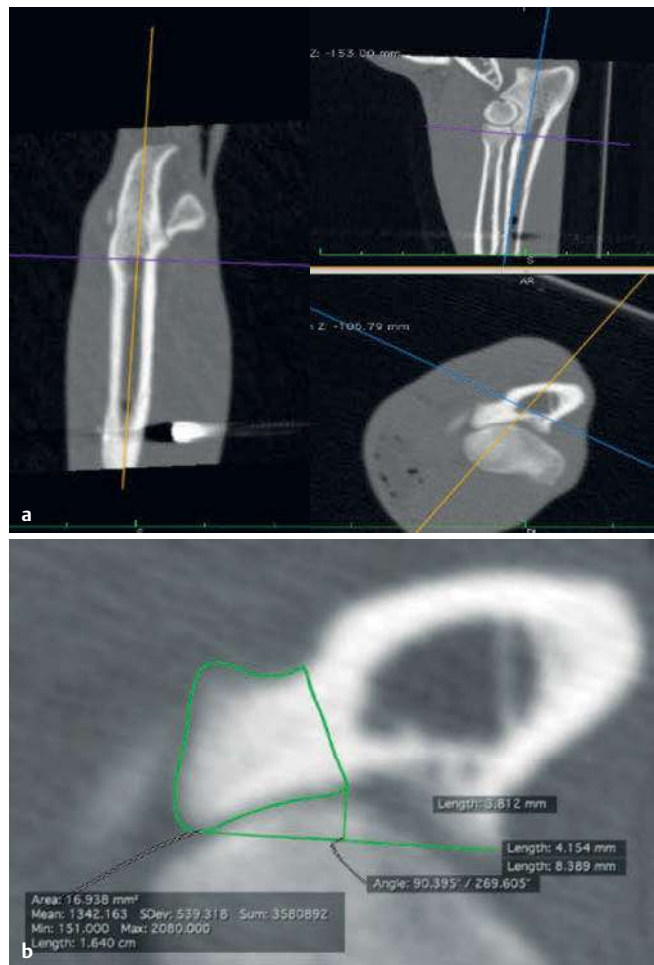
► **Fig. 1** Positioning: For the CT examination the red foxes were placed in sternal recumbency with forelimbs extended in direction of the gantry. The left and the right forelimbs were stretched cranially in order to extend the elbow joints. Both elbow joints were scanned simultaneously. The head was positioned laterally to avoid beam hardening artefacts. Source: © L. M. Holbein.

von Aufhärungsartefakten nach lateral gebeugt (► **Abb. 1**). Beide Vordergliedmaßen wurden gleichzeitig mit einer Schichtdicke von 0,7 mm im Knochenfenster (window level: 2500 HU; window width: 500 HU) untersucht.

Die Auswertung der CT-Aufnahmen erfolgte mithilfe des Softwareprogramms Horos (The Horos Project, Horos v 3.3.5) durch eine Doktorandin im 4. Ausbildungsjahr zur Fachtierärztin für Radiologie und andere bildgebende Verfahren in Konsens mit einem offiziellen GRSK-Gutachter (GRSK = Gesellschaft für Röntgendiagnostik genetisch beeinflusster Skeletterkrankungen beim Kleintier) und Diplomate des European College of Veterinary Diagnostic Imaging. Bei der Analyse der Schnittbilder wurde vor allem auf das Vorliegen einer Primärläsion, die Abgrenzbarkeit und Konformation des PCMU sowie auf osteophytäre Zubildungen geachtet. Als Primärläsion wurde das Vorliegen eines Fragments oder einer Fissurlinie innerhalb des PCMU gewertet. Die Konformation des PCMU wurde nach Karpenstein [21] als rund, spitz, abgeflacht oder unregelmäßig beschrieben. Die Einteilung des Arthrosegrads erfolgte nach IEWG von 0 (keine Arthrose) über B (minimale osteophytäre Zubildungen am Processus anconaeus), 1 (osteophytäre Zubildungen <2 mm) und 2 (osteophytäre Zubildungen 2–5 mm) bis 3 (osteophytäre Zubildungen >5 mm) [13]. Zudem wurden die Dichte und die Fläche des durch Hilfslinien definierten PCMU an einem festgelegten Transversalschnitt gemessen (► **Abb. 2**).

Vergleich Rotfuchs/Haushund

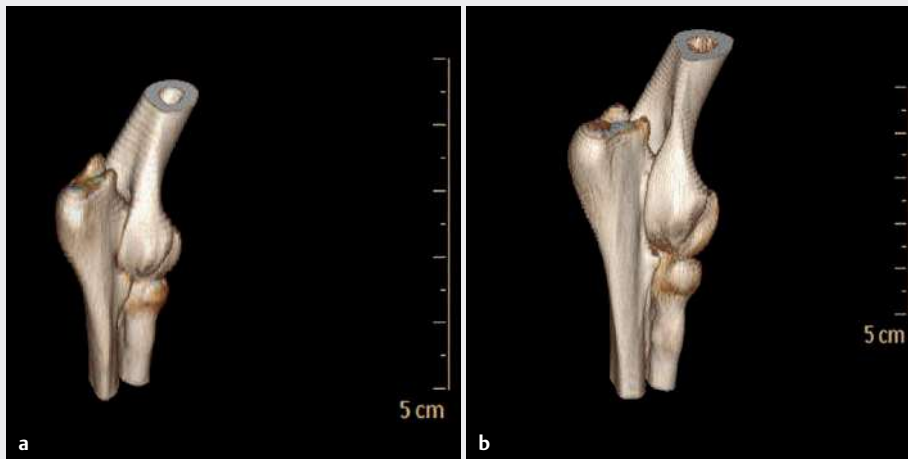
Die Befunde an den Ellbogengelenken der Rotfüchse wurden mit denen von Haushunden mittelgroßer und großer Rassen verglichen. Dabei handelte es sich um 17 verstorbene Tiere, bei denen kein Hinweis auf eine erworbene Ellbogengelenkerkrankung mit resultierender Veränderung der Knochenstruktur bestand. Anfer-



► **Abb. 2 a** Die Ausrichtung der Hilfslinien des definierten Transversalschnitts zur Messung der Fläche und Dichte des Processus coronioideus medialis ulnae erfolgte im Dorsal- und Sagittalschnitt entlang der Achse der Ulna. **b** Vergrößerte Darstellung des Transversalschnitts inklusive Hilfslinien zur Definition des inneren Kronfortsatzes. Quelle: © L. M. Holbein.

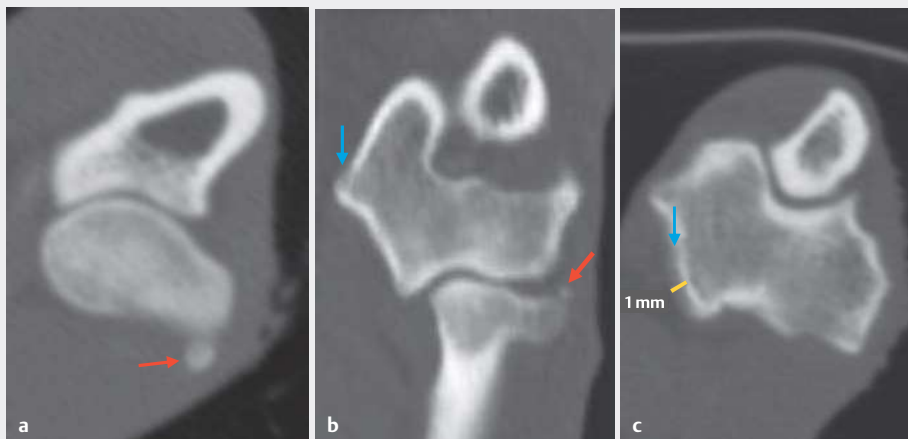
► **Fig. 2 a** Definition of the transverse section for the measurement of the extent and attenuation of the medial coronoid process by auxiliary lines orientated along the ulna. **b** Enlarged representation of the transverse section including auxiliary lines by which the medial coronoid process is defined. Source: © L. M. Holbein.

tigung und Auswertung der CT-Aufnahmen jeweils beider Ellbogengelenke entsprachen der Vorgehensweise bei den Rotfuchskadavern. Um die Messwerte der beiden Spezies vergleichbar zu machen, wurde der Humerusdurchmesser auf Höhe des Gelenkspalts als Referenzwert für die Größe der Tiere mitgemessen. Aus dem Humerusdurchmesser wurde eine Kreisfläche errechnet, die im Folgenden als Fläche des Humerus bezeichnet wird. Die statistische Auswertung der computertomografisch ermittelten Messwerte erfolgte mit dem Softwareprogramm BMDP (BMDP Statistical Software, Inc. Statistical Solutions Ltd. Ireland). Neben der Darstellung der Messwerte in einem Punktwolkendiagramm wurde zum Vergleich der Fläche des PCMU der Rotfüchse und der Haushunde der t-Test eingesetzt. Durch Einbeziehung der Fläche des Humerus fand die Größe der Tiere Berücksichtigung.



► **Abb. 3** Dreidimensionale CT-Rekonstruktion des Ellbogengelenks eines Rotfuchses (a) sowie eines Deutschen Schäferhundes (b). Neben der Größendifferenz fällt eine große Ähnlichkeit der Gelenke mit geringgradig ausgeprägten artspezifischen Charakteristika wie z. B. der Kontur des Olekranons auf. Quelle: © L. M. Holbein.

► **Fig. 3** Three-dimensional CT reconstruction of the elbow joint of a red fox (a) and a German shepherd dog (b). Apart from the size difference as well as minor species-specific characteristics, e. g. regarding the contour of the olecranon, pronounced similarity is evident. Source: © L. M. Holbein.



► **Abb. 4** Computertomografische Befunde. Mineralisationen (rote Pfeile) im Weichteilgewebe lateral des Caput radii in unterschiedlichen Ausprägungen (a, b). Hierbei handelt es sich um das Sesambein des M. supinator bzw. des Lig. collaterale laterale. In ► **Abb. 4b** und ► **Abb. 4c** sind geringgradige osteophytäre Ausziehungen (blaue Pfeile) medial am Condylus humeri zu sehen. Quelle: © L. M. Holbein.

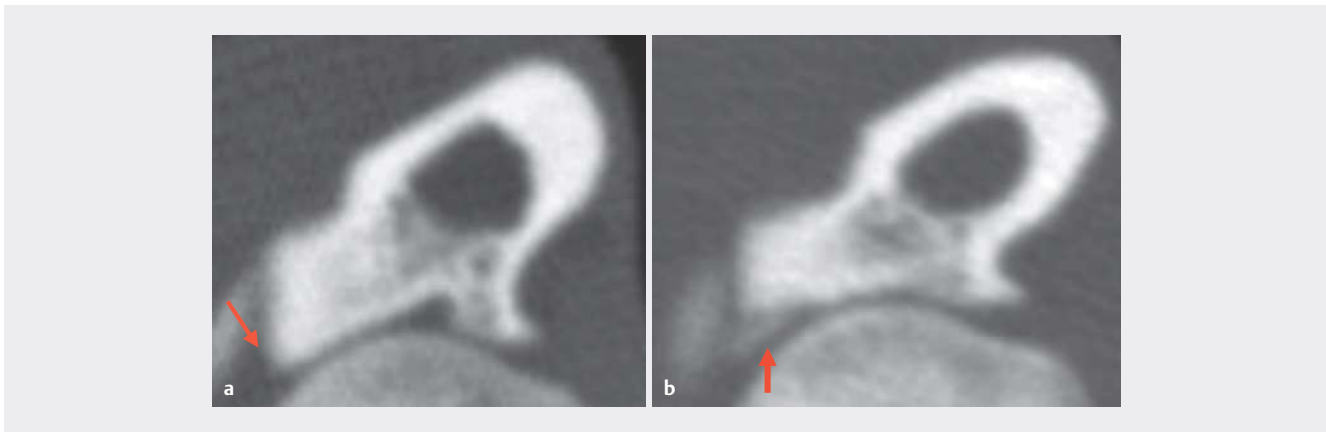
► **Fig. 4** Computed tomography images. Mineralization of different grades in the soft tissue lateral to the radial head (red arrows) (a, b) which represents the sesamoid bone of the supinator muscle or the lateral collateral ligament. In ► **Fig. 4b** and ► **Fig. 4c** slight osteophytes in the area of the medial humeral condyle (blue arrows) are appreciable. Source: © L. M. Holbein.

Ergebnisse

Anatomische Strukturen im Vergleich der Spezies

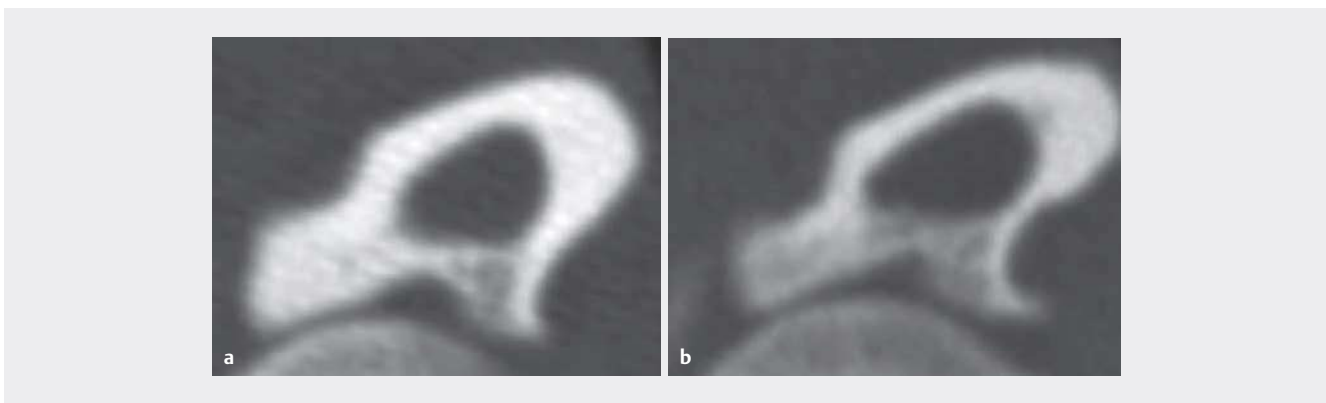
Im direkten Vergleich der anatomischen Strukturen der Ellbogengelenke der Rotfuchse und der mittelgroßen und großen Haushunde fiel zunächst eine große Ähnlichkeit auf (► **Abb. 3**). Neben der Größendifferenz zeigten sich geringgradige artspezifische Unterschiede. Das Olekranon des Rotfuchses stellte sich im Transversal-

schnitt abgerundeter dar als das der Hunde. Des Weiteren konnten am Tuber olecrani der Ellbogengelenke der Rotfuchse 2 prominente knöcherne Ausziehungen nachvollzogen werden. Diese sind beim Haushund wesentlich flacher ausgeprägt (► **Abb. 3**). Bei 52 Ellbogengelenken der Rotfuchse (55,3%) lag zudem eine Mineralisation im Weichteilgewebe lateral des Caput radii vor (► **Abb. 4a**, ► **Abb. 4b**). Hierbei handelt es sich um das Sesambein des M. supinator bzw. des Lig. collaterale laterale [8].



► **Abb. 5** Computertomografische Befunde des pathologisch veränderten Processus coronoideus medialis ulnae (PCMU) beim Rotfuchs. **a** Fissurlinie an der Spitze des PCMU („tip fragment“) (Pfeil). **b** Fragmentierung entlang der Incisura radialis ulnae (Pfeil). Quelle: © L. M. Holbein.

► **Fig. 5** Computed tomography findings of the pathologically altered medial coronoid process in red foxes. **a** Fissure line within tip of the medial coronoid process (tip fragment) (arrow). **b** Fragmentation along the radial incisura of the ulna (arrow). Source: © L. M. Holbein.



► **Abb. 6** Kontur des Processus coronoideus medialis ulnae (PCMU) bei Rotfüchsen. Scharf (a) bzw. geringgradig unscharf (b) abgrenzbare Spitze des PCMU. Quelle: © L. M. Holbein.

► **Fig. 6** Contour of the medial coronoid process in red foxes. Sharply (a) and slightly blurred (b) apex of the medial coronoid process, respectively. Source: © L. M. Holbein.

Vorkommen der ED beim Rotfuchs

Bei einem Ellbogengelenk ließ sich eine Zusammenhangstrennung des PCMU entlang der Incisura radialis ulnae darstellen. Ein weiteres Ellbogengelenk zeigte eine Fissurlinie mit dichtegeminderter Spitze im Sinne eines „tip fragments“ (► **Abb. 5**). Im umgebenden Gewebe dieser verdächtigen Ellbogengelenke konnten keine Schrotkugeln oder andere Hinweise auf ein akutes Trauma gefunden werden. Die restlichen 92 Ellbogengelenke der Rotfüchse wiesen keine Anzeichen für das Vorliegen einer Primärläsion der ED auf.

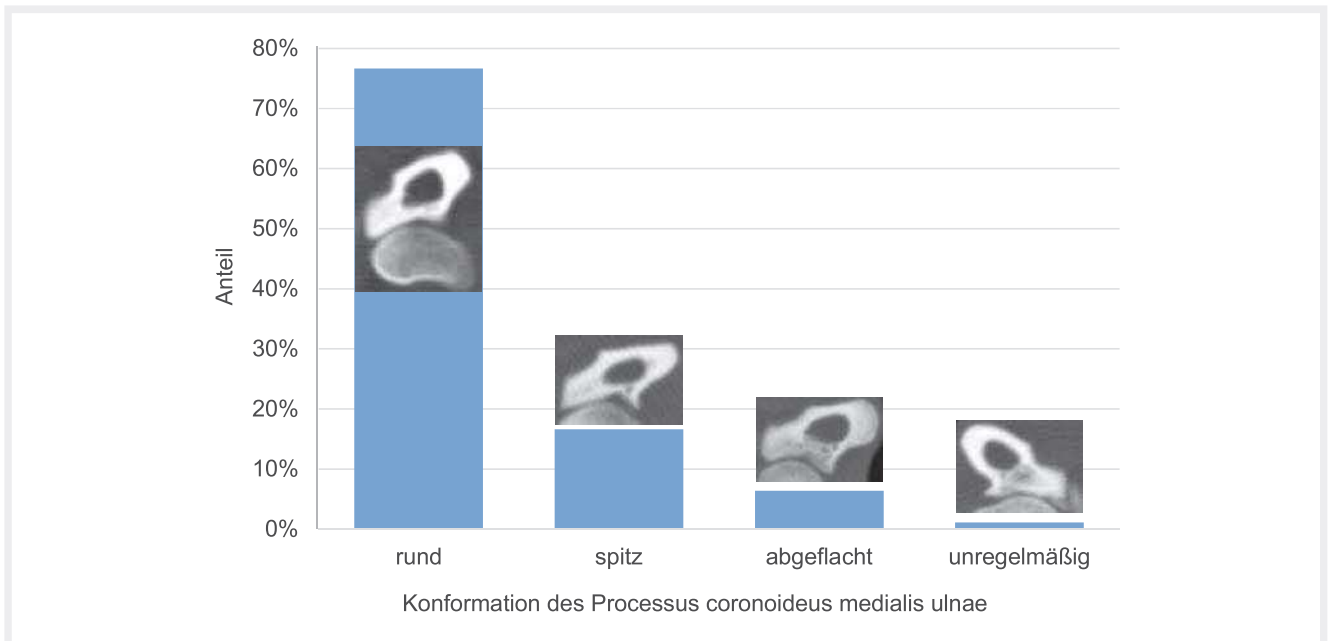
Konformation des PCMU

Die Kontur des PCMU stellte sich bei allen untersuchten Ellbogengelenken der Rotfüchse scharf abgrenzbar (67,0%) oder geringgradig unscharf abgrenzbar (33,0%) dar (► **Abb. 6**). Bei 72 der 94 untersuchten Ellbogengelenke (76,6%) lag eine runde Konformation des PCMU vor, bei 15 (16,6%) eine spitze, bei 6 (6,4%) eine abgeflachte und bei 1 (1,1%) eine unregelmäßige Konformation (► **Abb. 7**).

Zudem fiel bei den Rotfüchsen subjektiv eine verstärkt mediolaterale Ausprägung des Koronoids im Vergleich zu den Haushunden auf. Dabei hatte der PCMU der Rotfüchse an der Spitze nahezu die gleiche Breite wie an der Basis (► **Abb. 8**).

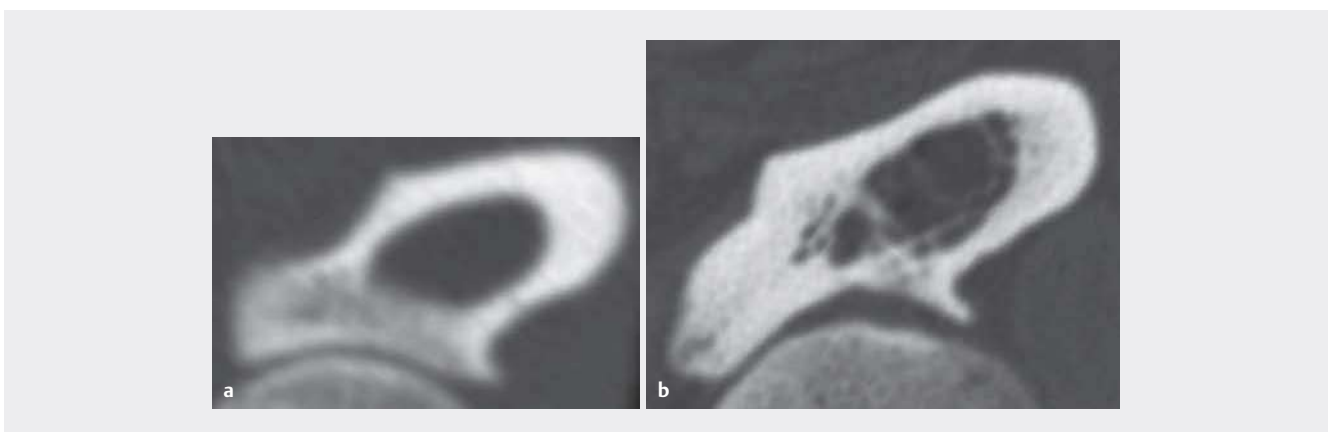
Vorliegen einer Arthrose

Bei 76 der 94 Ellbogengelenke (80,9%) konnten keine Anzeichen von Arthrose festgestellt werden. Siebzehn Ellbogengelenke (18,0%) zeigten geringgradige osteophytäre Zubildungen (Arthrosegrad B oder 1), die insbesondere an der Ulna sowie am Epicondylus medialis humeri zu finden waren (► **Abb. 4b**, ► **Abb. 4c**). Ein Ellbogengelenk (1,1%) wurde mit mittelgradig osteophytären Zubildungen am PCMU beurteilt, was dem Arthrosegrad 2 entspricht.



► **Abb. 7** Verteilung der unterschiedlichen Konformationen des Processus coronoideus medialis ulnae bei den untersuchten Rotfüchsen. Die runde Konformation dominiert deutlich. Quelle: © L. M. Holbein.

► **Fig. 7** Distribution of the different conformations of the medial coronoid process within the evaluated red foxes. The roundish conformation occurred over average. Source: © L. M. Holbein.



► **Abb. 8** Vergleich des Processus coronoideus medialis ulnae (PCMU) beim Rotfuchs und Haushund. Vermehrt mediolaterale Ausprägung des PCMU beim Rotfuchs (a), verstärkt elongierter PCMU beim Haushund (b). Quelle: © L. M. Holbein.

► **Fig. 8** Comparison of the medial coronoid process (PCMU) between red fox and domestic dog. Mediolateral extended PCMU in the red fox (a) and more elongated PCMU in the domestic dog (b). Source: © L. M. Holbein.

Dichte und Fläche des PCMU

Bei den Rotfüchsen wurde die Dichte des PCMU mit Werten von 1036–1532 HU und einem Mittelwert von $1291,0 \pm 92,7$ HU gemessen. Sehr ähnliche Werte ergaben sich bei den Haushunden (► **Tab. 1**). Die Fläche des PCMU der Rotfüchse wies eine Spanne von 11,7 bis 22,7 mm² mit einem Mittelwert von $17,11 \pm 2,39$ mm² auf (► **Tab. 1**). Bei einer Gegenüberstellung der absoluten Werte der Fläche des Koronoids sowie des Humerus der Hunde- und Fuchspopulation fiel auf, dass die absoluten Werte der Flächen der Hundellbogen signifikant größer waren als die der Fuchsellbogen. Zudem

zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen der Fläche des Humerus sowie des PCMU (► **Abb. 9**). Im Vergleich der Fläche des PCMU der Haushunde und der Rotfüchse unter Berücksichtigung der Humerusfläche als Referenzwert ließ sich kein signifikanter Unterschied nachweisen ($p = 0,14$) (► **Tab. 2**).

Diskussion

Die vermutete große anatomische Ähnlichkeit des Ellbogengelenks des Rotfuchses und des Haushundes ließ sich mit der vorliegenden Studie bestätigen. Im direkten Vergleich der Ellbogengelen-

► **Tab. 1** Vergleich der Fläche des Processus coronoideus medialis ulnae (PCMU) und des Humerus, des Humerusdurchmessers sowie der Dichte des PCMU bei Ellbogengelenken von Rotfüchsen und Haushunden. Angabe der Werte als Mittelwert \pm Standardabweichung.

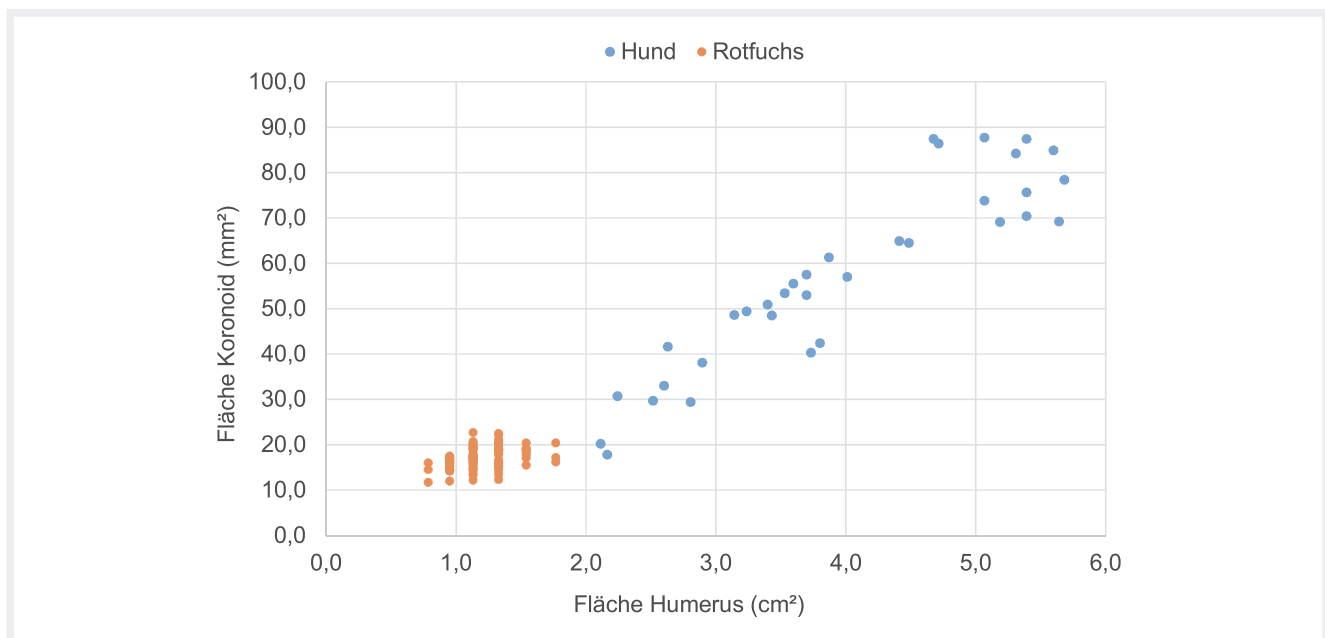
► **Table 1** Comparison of the area of the medial coronoid process and the humerus, the diameter of the humerus as well as the density of the medial coronoid process of the elbow joints of red foxes and domestic dogs. Values given as mean \pm standard deviation.

	Rotfuchs	Hund
Fläche des PCMU (mm ²)	17,11 \pm 2,39	57,12 \pm 20,52
Humerusdurchmesser (cm)	1,23 \pm 0,11	2,24 \pm 0,35
Fläche des Humerus (cm ²)	1,19 \pm 0,21	4,03 \pm 1,20
Dichte des PCMU (HU)	1291,0 \pm 92,7	1322,9 \pm 181,2

► **Tab. 2** Vergleich der Fläche des Processus coronoideus medialis ulnae zwischen Rotfüchsen und Haushunden unter Berücksichtigung der Humerusfläche als Referenzwert für die Größe der Tiere (t-Test). Angabe der Werte als Mittelwert \pm Standardabweichung.

► **Table 2** Comparison of the area of the medial coronoid process in red foxes and domestic dogs taking the humerus area as a reference value for the size of the animals (t-test). Values given as mean \pm standard deviation.

	Rotfuchs	Hund	p-Wert
Adjustierte Gelenkflächen	20,56 \pm 2,21	24,76 \pm 7,48	p < 0,05
Verhältnis Fläche Koronoid : Fläche Humerus	14,66 \pm 2,47	13,96 \pm 2,08	p = 0,14



► **Abb. 9** Darstellung des linearen Zusammenhangs der Fläche des Humerus sowie des Processus coronoideus medialis ulnae der Ellbogengelenke von Rotfüchsen und Haushunden. Quelle: © L. M. Holbein.

► **Fig. 9** Illustration of the linear relationship between the area of the humerus and the medial coronoid process in elbow joints of red foxes and domestic dogs. Source: © L. M. Holbein.

ke beider Spezies wurden allerdings geringgradige artspezifische Unterschiede insbesondere am Olekranon und am PCMU sowie eine signifikante Größendifferenz festgestellt (► **Abb. 3**). Zudem konnte bei 55,3 % der Ellbogengelenke der Rotfüchse ein Sesambein des M. supinator bzw. des Lig. collaterale laterale dargestellt werden (► **Abb. 4a**, ► **Abb. 4b**). Die Inzidenz für das Auftreten dieses Sesambeins beträgt beim Hund 31 % [1][23][47]. Das Vorkommen von Sesambeinen hängt sowohl von genetischen Faktoren als auch von extrinsischen epigenetischen Stimuli wie mechanischem Stress durch vermehrte Muskelaktivität oder skelettalen Gegebenheiten ab [39]. Durch die Untersuchung von Rotfüchsen aus 4 Regionen Deutschlands (Mittelhessen, Eifel, Niederrhein und Pader-

borner Land) ist eine genetische Verwandtschaft aller Rotfüchse nahezu ausgeschlossen. Rotfüchse wandern als Jungtiere maximal 80 km vom Areal der Eltern ab und bewegen sich in einem Aktionsraum von 0,5–10 km² [3]. Tiere einer Region können theoretisch genetisch verwandt sein, während bei Rotfüchsen unterschiedlicher Regionen mit hoher Wahrscheinlichkeit keine Verwandtschaft besteht. Neben der genetischen Komponente kann das vermehrte Vorkommen des Sesambeins lateral des Ellbogengelenks beim Rotfuchs für eine höhere Agilität und körperliche Aktivität im Vergleich zum Haushund sprechen. Ebenso wie beim Hund ist das Auftreten eines Sesambeins im M. supinator bzw. Lig. collaterale laterale als Zufallsbefund zu werten [23].

Bei 2 Ellbogengelenken von Rotfüchsen aus unterschiedlichen Regionen wurden pathologische Veränderungen des PCMU festgestellt (► **Abb. 5**). Little et al. [27] beschreiben Verletzungen und Traumata als eine der häufigsten Erkrankungen beim Rotfuchs. Das umgebende Gewebe dieser beiden Ellbogengelenke zeigte allerdings keinen Hinweis auf ein akutes traumatisches Ereignis. Daher kann ein chronisches Geschehen im Sinne einer Koronoidpathologie oder eines länger zurückliegenden Traumas mit verzögerter oder ausbleibender Frakturheilung innerhalb des PCMU vermutet werden. Das Vorkommen geringgradiger osteophytärer Ausziehungen, die bei beiden pathologisch veränderten Ellbogengelenken nachweisbar waren, unterstützt die Annahme der Chronizität des Geschehens. Fitzpatrick et al. [12] unterscheiden bei pathologischen Veränderungen innerhalb des PCMU anhand des Verlaufs der Fissur- bzw. Frakturlinie zwischen einer Läsion an der Spitze des inneren Kronfortsatzes („tip fragment“) und einer Läsion entlang der Incisura radialis ulnae. Aufgrund der differierenden Struktur des subchondralen Knochens werden verschiedene Ätiopathogenesen der beiden Läsionsarten vermutet. In der vorliegenden Studie wurde ein pathologisch beurteiltes PCMU mit einer Läsion entlang der Incisura radialis ulnae und einer mit einer Läsion im Sinne eines „tip fragments“ gefunden. Ob bei einer der Läsionen eine traumatische Komponente in der Ätiopathogenese eine Rolle spielte oder biomechanische Prozesse und Überlastung die Ursache waren, kann nur spekuliert werden. Beim Haushund stellt die traumatisch bedingte Fraktur des PCMU eine sehr seltene Erkrankung des Ellbogengelenks dar [40]. Beim Rotfuchs sind traumatisch bedingte Läsionen des PCMU denkbar, wurden aber, ebenso wie andere pathologische Knochenveränderungen, noch nicht eingehend wissenschaftlich untersucht. Veränderungen des Koronoids treten beim Haushund häufig bilateral auf [46]. In der vorliegenden Studie war das kontralaterale Ellbogengelenk bei beiden Rotfüchsen computertomografisch unauffällig und somit ließ sich ein bilaterales Auftreten der PCMU-Läsionen nicht nachvollziehen. Zur Differenzierung zwischen einem fragmentierten PCMU und einer traumatisch bedingten Fraktur des inneren Kronfortsatzes könnte eine histologische Untersuchung der betroffenen Ellbogengelenke weitere Erkenntnisse bringen.

In der vorliegenden Studie waren pathologische Veränderungen des PCMU bei 2 Ellbogengelenken von Rotfüchsen feststellbar. Die resultierende Prävalenz der ED beim Rotfuchs ist damit mit der bei Hunden kleiner Rassen vergleichbar [31]. Das geringere Körpergewicht der Rotfüchse und die folglich vermutete geringere Belastung der Ellbogengelenke im Vergleich zu denen von Hunden prädisponierter Rassen könnte für die geringe Prävalenz der ED bei Rotfüchsen verantwortlich sein [26][29]. In der vorliegenden Studie konnte die geringere Belastung des Koronoids durch die computertomografisch bestimmten Fläche- und Dichtewerte nicht bestätigt werden. Die absolute Fläche des PCMU betrug bei Rotfüchsen 11,7–22,7 mm² (Mittelwert 17,11 ± 2,39 mm²). Bei den untersuchten Haushunden wurden bei gleicher Definition des PCMU absolute Flächen von 17,8–87,7 mm² (Mittelwert 57,12 ± 20,52 mm²) gemessen (► **Tab. 1**). Karpenstein [21] und Wennemuth [45] ermittelten bei ähnlicher Definition des PCMU Werte zwischen 31,0 und 72,6 mm² bzw. zwischen 39,2 und 87,6 mm² mit einem Mittelwert von 65,5 ± 9,4 mm². Unter Berücksichtigung der aus den computertomografisch bestimmten Humerusdurchmessern errechneten

Humerusflächen, die als Referenzwerte für die Größe der Tiere dienten, resultierten in der vorliegenden Studie vergleichbar große Flächen des PCMU bei Rotfüchsen und Haushunden ($p = 0,14$) (► **Tab. 2**). Die Dichtemessung des PCMU ergab bei den Rotfüchsen Werte von 1036–1532 HU (Mittelwert 1291,0 ± 92,7 HU), bei den Hunden Werte zwischen 907 und 1621 HU (Mittelwert 1322,9 ± 181,2 HU) (► **Tab. 1**). In der Studie von Holbein [18], in der der Transversalschnitt des Koronoids des kaninen Ellbogengelenks in 4 Areale eingeteilt wurde, lagen die Mittelwerte zwischen 1111 und 1444 HU (1111 HU, 1257 HU, 1318 HU und 1444 HU). Wennemuth [45] bestimmte bei Haushunden einen Mittelwert von 1238 ± 183 HU und Oltersdorf [33] durchschnittliche Dichtewerte zwischen 1131 und 1247 HU (1131 HU, 1172 HU, 1173 HU, 1205 HU, 1211 HU und 1247 HU), abhängig von der gemessenen Schicht des PCMU und des Vorliegens pathologischer Veränderungen des Koronoids. Karpenstein [21] ermittelte je nach gemessener Schicht des PCMU einen Mittelwert von 1314 HU, 1382 HU und 1455 HU. Die Dichte des PCMU von Rotfüchsen und Haushunden ist damit ebenfalls vergleichbar.

Im Vergleich zum Haushund fiel beim Rotfuchs subjektiv eine verstärkte mediolaterale Ausprägung des PCMU auf (► **Abb. 8**). Die distale Artikulationsfläche des Humerus im Ellbogengelenk des Rotfuchses wird in der Literatur ebenfalls mit relativ breiter mediolateraler Ausprägung beschrieben [2]. Daher könnte die Hypothese aufgestellt werden, dass beim Rotfuchs aufgrund der verstärkten mediolateralen Ausprägung der medialen Gelenkfläche des Ellbogengelenks im Vergleich zu anderen Tierarten eine bessere Lastenverteilung im Ellbogengelenk besteht, was Einfluss auf das Auftreten pathologischer Veränderungen des Koronoids haben könnte. Allerdings war in der vorliegenden Studie unter Berücksichtigung der Körpergröße von Rotfuchs und Haushund weder ein signifikanter Unterschied der Dichte noch der Gesamtfläche des Koronoids feststellbar, was gegen eine niedrigere Druckbelastung des PCMU beim Rotfuchs im Vergleich zum Haushund spricht. Bei der verstärkten mediolateralen Ausprägung des Koronoids handelt es sich vermutlich um eine speziesspezifische Besonderheit in der Anatomie des Ellbogengelenks des Rotfuchses mit fraglichem Einfluss auf die Entstehung pathologischer Veränderungen des Koronoids und die Biomechanik des Gelenks. Beim Haushund wurde in einer aktuellen Studie der Einfluss der statischen Druckbelastung auf das Koronoid als Ursache für den fragmentierten PCMU infrage gestellt und eine dynamische Komponente untersucht [37]. Bisher gibt es jedoch keine Studie, die beim Fuchs die Kontaktfläche zwischen PCMU und Humerus statisch oder dynamisch untersucht hat. Somit ist der Einfluss der Anatomie auf die Entwicklung pathologischer Veränderungen des Koronoids weiterhin unklar und bei der Suche nach deren Ätiopathogenese muss (neben der Berücksichtigung der Anatomie des Ellbogengelenks) der Fokus auf weitere Faktoren, wie z. B. die Genetik, Umweltfaktoren und insbesondere die Biomechanik des Ellbogengelenks, gelegt werden [7][15][28][37].

Bei 18,0% der Ellbogengelenke der Rotfüchse ließen sich geringgradige osteophytäre Zubildungen (Arthrosegrad B und 1) nachweisen, die überwiegend am Epicondylus medialis humeri und an der Ulna vorlagen (► **Abb. 4b**, ► **Abb. 4c**). Osteophytäre Zubildungen entstehen bei Fehl- oder Überbelastung von Gelenken, als Folge von Verletzungen oder durch Verschleiß mit zunehmendem Alter [35]. Nach Andersson [2] könnte die beschriebene Lokalisa-

tion der osteophytären Zubildungen darin begründet sein, dass der Rotfuchs im Vergleich zu anderen Tierarten, z. B. dem Wolf, eine größere nach medial ausgeprägte Artikulationsfläche im Ellbogengelenk besitzt.

Beim Haushund wird in unterschiedlichen Studien die runde Konformation des PCMU mit ca. 40 % als häufigste Konformation beschrieben [21][45]. In der vorliegenden Studie zeigte sich bei den Ellbogengelenken der Rotfüchse mit 76,6 % überproportional häufig die runde Konformation (► **Abb. 7**). Dies führt zur Hypothese, dass die runde Konformation die physiologische und ursprüngliche Konformation ist. Die spitze und die abgeflachte Konformation lagen bei 16,6 % bzw. 6,4 % der Ellbogengelenke der Rotfüchse vor und könnten somit als Normvariante gewertet werden. Die unregelmäßige Konformation, die bei Hunden als fraglicher Hinweis auf das Vorliegen eines fragmentierten PCMU gilt [21], wurde bei einem der als pathologisch gewerteten Ellbogengelenke der Rotfüchse festgestellt.

Zwei Drittel der Ellbogengelenke der Rotfüchse wiesen eine scharf abgrenzbare kraniale Kontur des PCMU auf (► **Abb. 6**). Die unscharfe Abgrenzbarkeit bei einem Drittel der Ellbogengelenke ist wahrscheinlich durch das Partialvolumenartefakt bedingt, da die Strukturen des Ellbogengelenks des Rotfuchses physiologischerweise aufgrund der geringeren Körpergröße im Vergleich zum Haushund relativ klein sind.

Die in der vorliegenden Studie erhobenen Befunde und Ergebnisse sind ein erster Schritt zur Erforschung der Ellbogengelenke der Wildtiere mit dem Ziel, die Entwicklung der ED besser zu verstehen.

FAZIT FÜR FORSCHUNG UND PRAXIS

Das Ziel, die Verbreitung der ED beim Hund durch selektives Züchten zu minimieren, kann einerseits durch die ED-Zuchtuntersuchung und den damit verbundenen Zuchtausschluss bei Verdacht auf bzw. Nachweis pathologischer Koronoidveränderungen erreicht werden. Ein anderer Ansatz ist das gezielte Züchten auf bestimmte morphologische Merkmale des PCMU, die nicht oder nur sehr selten zusammen mit pathologischen Veränderungen des PCMU auftreten. Hierbei kann der Vergleich mit Wildtieren wie z. B. Wolf oder Rotfuchs helfen. In der vorliegenden Studie fielen sowohl eine vermehrte mediolaterale Ausprägung des Koronoids als auch eine überdurchschnittlich häufig auftretende runde Konformation des PCMU beim Rotfuchs auf. Diese könnten ein solches morphologisches Merkmal sein. Als Ausblick ist es interessant, weitere verwandte Tierarten des Haushundes wie z. B. den Wolf sowie Rotfüchse aus anderen Regionen Deutschland, Europas und der nördlichen Hemisphäre zu untersuchen. Zur optimalen Interpretation der pathologischen Befunde sollten sich an die CT-Untersuchungen der Ellbogengelenke histologische Untersuchungen anschließen.

Interessenkonflikt

Die Autoren bestätigen, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

- [1] Allan G, Davies S. Radiographic signs of joint disease in dogs and cats. In: Thrall DE. Textbook of Veterinary Diagnostic Radiology. 7th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2018: 403–433
- [2] Andersson KI. Elbow-joint morphology as a guide to forearm function and foraging behaviour in mammalian carnivores. Zool J Linn Soc 2004; 142 (1): 91–104
- [3] Aulagnier S, Haffner P, Mitchell-Jones AJ et al. Die Säugetiere Europas, Nordafrikas und Vorderasiens. Der Bestimmungsführer. 1. Aufl. Bern: Haupt 2009; 104
- [4] Bardet JF. Arthroscopy of the elbow in dogs. Part II: Cranial portals in the diagnosis and treatment of the lesions of the coronoid process. Vet Comp Orthop Traumatol 1997; 10 (2): 60–66
- [5] Beuing R, Mues CH, Tellhelm B et al. Prevalence and inheritance of canine elbow dysplasia in German Rottweiler. J Anim Breed Genet 2000; 117 (6): 375–383
- [6] Burton NJ, Perry MJ, Fitzpatrick N et al. Comparison of bone mineral density in medial coronoid process of dogs with and without medial coronoid process fragmentation. Am J Vet Res 2010; 71 (1): 41–46
- [7] Burton NJ, Warren-Smith CMR, Roper DP et al. CT assessment of the influence of dynamic loading on physiological incongruity of the canine elbow. J Small Anim Pract 2013; 54 (6): 291–298
- [8] Constantinescu GM, Constantinescu IA. A clinically oriented comprehensive pictorial review of canine elbow anatomy. Vet Surg 2009; 38 (2): 135–143
- [9] Cook CR, Cook JL. Diagnostic imaging of canine elbow dysplasia: A review. Vet Surg 2009; 38 (2): 144–153
- [10] Dickomeit MJ, Böttcher PB, Hecht S et al. Topographic and age-dependent distribution of subchondral bone density in the elbow joint of clinically normal dogs. Am J Vet Res 2011; 72 (4): 491–499
- [11] Everts RE. Molecular genetic studies in the dog: Application of fragmented coronoid process (FCP) in the Labrador Retriever [PhD Dissertation]. Utrecht: Universität Utrecht; 2000: 31–42
- [12] Fitzpatrick N, Garcia TC, Daryani A et al. Micro-CT structural analysis of the canine medial coronoid disease. Vet Surg 2016; 45 (3): 336–346
- [13] Flückiger M. Radiographic diagnosis of elbow dysplasia in the dog: Requirements for the IEWG standardized screening procedure. In: IEWG Proceedings of the 25th Annual Meeting of the International Elbow Working Group. Bologna; 2010: 8–13
- [14] Freire M, Meuten D, Lascelles D. Pathology of articular cartilage and synovial membrane from elbow joints with and without degenerative joint disease in domestic cats. Vet Pathol 2014; 51 (5): 968–978
- [15] Gemmill TJ, Clements DN. Fragmented coronoid process in the dog. Is there a role of incongruity? J Small Anim Pract 2007; 48 (7): 361–368
- [16] Grimmberger E. Die Säugetiere Deutschlands. Wiebelsheim: Quelle & Meyer 2014; 366–371
- [17] Hazewinkel HAW. Elbow dysplasia, definition and known aetiologies. In: IEWG Proceedings of the 22th Annual Meeting of the International Elbow Working Group. München; 2007: 6–9
- [18] Holbein LM. Vergleichende Untersuchung des Processus coronoideus medialis ulnae des caninen Ellbogengelenks: histologische und computertomographische Befunde [Dissertation]. Gießen: Justus-Liebig-Universität Gießen 2020: 115–117

- [19] Jackson HHT. Mammals of Wisconsin. Madison: The University of Wisconsin Press 1961; 298–306
- [20] Janutta V, Distl O. Review on canine elbow dysplasia: pathogenesis, diagnosis, prevalence and genetic aspect. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 2008; 115 (5): 172–181
- [21] Karpenstein H. Die computertomographische Morphologie und Anatomie des Ellbogengelenkes mit Schwerpunkt des Processus coronoideus medialis ulnae bei mit ED = 0 beurteilten Hunden spezieller Rassen [Dissertation]. Gießen: Justus-Liebig-Universität Gießen 2010; 42–50, 68–76, 89–129
- [22] Kerwin SC. Osteoarthritis in cats. *Top Companion Anim Med* 2010; 25 (4): 218–223
- [23] Kirberger RM. Ellbogengelenk. In: Barr FJ, Kirberger RM. *BSAVA Handbuch-Bildgebende Diagnostik des muskuloskelettalen Systems bei Hund und Katze*. München: Urban & Fischer 2009; 132
- [24] Kirberger RM, Fourie SL. Elbow dysplasia in the dog: pathophysiology, diagnosis and control. *J S Afr Vet Assoc* 1998; 69 (2): 43–45
- [25] Klumpp S, Karpenstein H, Tellhelm B et al. Computed tomography morphology and anatomy of the elbow joint of specific dog breeds focusing on the medial coronoid process in ED 0 scored dogs. *Kleintierprax* 2013; 58 (2): 57–64
- [26] LaFond E, Breur GJ, Austin CC. Breed susceptibility for developmental orthopedic diseases in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 2002; 38 (5): 467–477
- [27] Little SE, Davidson WR, Howerth EW et al. Diseases diagnosed in red foxes from the southeastern United States. *J Wildl Dis* 1998; 34 (3): 620–624
- [28] Mäki K, Liinamo AE, Ojala M. Estimates of genetic parameters for hip and elbow dysplasia in Finnish Rottweilers. *J Anim Sci* 2000; 78 (5): 1141–1148
- [29] Morgan J, Wind A, Davidson AP. Elbow dysplasia. Hereditary bone and joint diseases in the dog. 1st ed. Hannover: Schlütersche; 2000: 41–69, 77–87
- [30] Morgan J, Wind A, Davidson AP. Bone dysplasias in the Labrador Retriever: A radiographic study. *J Am Anim Hosp Assoc* 1999; 35 (4): 332–340
- [31] Narojek T, Fiszdon K, Hanysz E. Canine elbow dysplasia in different breeds. *Bull Vet Inst Pulawy* 2008; 52 (1): 169–173
- [32] Nowak RM. Walker's mammals of the world. 6th ed. Baltimore: The John Hopkins University Press 1999; 636
- [33] Oltersdorf B. Retrospektive computertomographische Studie zum Vergleich der Knochendichte des Processus coronoideus medialis ulnae von Hunden unterschiedlicher Rassen mit und ohne arthroskopischem Hinweis auf eine Koronoiderkrankung [Dissertation]. Gießen: Justus-Liebig-Universität Gießen; 2015: 45–46, 88–101
- [34] Padgett GA, Mostosky UV, Probst CW et al. The inheritance of osteochondritis dissecans and fragmented coronoid process of the elbow joint in Labrador Retriever. *J Am Anim Hosp Assoc* 1995; 31 (4): 327–330
- [35] Pschyrembel W, Dornblüth O. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. 261. Aufl. Berlin: Walter de Gruyter; 2007: 151
- [36] Read RA, Armstrong SJ, Black AP et al. Relationship between physical signs of elbow dysplasia and radiographic score in growing Rottweilers. *J Am Vet Med Assoc* 1996; 209 (8): 1427–1430
- [37] Rohwedder T, Rebertrost P, Böttcher P. Three-dimensional joint kinematics in a canine elbow joint with medial coronoid disease before and after bi-oblique dynamic proximal ulnar osteotomy. *Vet Comp Orthop Traumatol Open* 2019; 2 (2): e44–e49
- [38] Samii VF, Les CM, Schulz KS et al. Computed tomographic osteoabsorptiometry of elbow joint in clinically normal dogs. *Am J Vet Res* 2002; 63 (8): 1159–1166
- [39] Sarin VK, Erickson GM, Giori NJ et al. Coincident development of sesamoid bones and clues to their evolution. *Anat Rec* 1999; 257 (5): 174–180
- [40] Tan DK, Canapp SO Jr, Leasure CS et al. Traumatic fracture of the medial coronoid process in 24 dogs. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2016; 29 (4): 325–329
- [41] Tirgari M. Clinical, radiographical and pathological aspects of ununited medial coronoid process of the elbow joint in dogs. *J Small Anim Pract* 1980; 21 (11): 595–608
- [42] Tirgari M. Clinical radiographical and pathological aspects of arthritis of the elbow joint in dogs. *J Small Anim Pract* 1974; 15 (11): 671–679
- [43] Van Ryssen B, van Bree H. Arthroscopic findings in 100 dogs with elbow lameness. *Vet Rec* 1997; 140 (14): 360–362
- [44] Voigt DR. Red Fox. In: Novak M, Baker JA, Obbard ME, Malloch B, eds. *Wild furbearer management and conservation in North America*. Ontario: Ontario Ministry of Natural Resources; 1987: 379–392
- [45] Wennemuth JH. Studie zum Vergleich von röntgenologischen und computertomographischen Befunden am Processus coronoideus medialis ulnae im ED-Obergutachten [Dissertation]. Gießen: Justus-Liebig-Universität Gießen; 2017: 79–80, 116–117, 125–140
- [46] Wind AP. Elbow dysplasia. In: Slatter D. *Textbook of Small Animal Surgery*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 1993: 1966–1977
- [47] Wood AK, McCarthy PH, Howlett CR. Anatomic and radiographic appearance of a sesamoid bone in the tendon of origin of the supinator muscle of dogs. *Am J Vet Res* 1985; 46 (10): 2043–2047

Originalarbeiten zum Kapitel 3.3

Studie 13

Sun, X., Gamal, M., Nold, P., Said, A., Chakraborty, I., Pelaz, B., Schmied, F., **von Pückler, K.**, Fiegel, J., Zhaog, Y., Brendel, C., Hassang, M., Parak, W., Feliu Torres, N. (2019):

Tracking stem cells and macrophages with gold and iron oxide nanoparticles – The choice of the best suited particles.

Applied Materials Today; 15, June: 267–279.

DOI: 10.1016/j.apmt.2018.12.006

Studie 14

Kolecka, M.A., Arnhold, S., Schmidt, M., Reich, C., Kramer, M., Failing, K., **von Pückler, K.** (2017):
Behaviour of adipose-derived canine mesenchymal stem cells after superparamagnetic iron oxide nanoparticles labelling for magnetic resonance imaging.

BMC Veterinary Research; 13: 62.

DOI 10.1186/s12917-017-0980-0

Studie 15

Von Pückler, K., John, K., Bokemeyer, J., Kramer, M., Arnhold, S. (2022):

MRI Tracking of Iron Oxide Labeled Canine Mesenchymal Stem Cells in Artificial Stifle Defects.

Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology; Nov; 35(6): 362–369.

DOI: 10.1055/s-0042-1750432.



Tracking stem cells and macrophages with gold and iron oxide nanoparticles – The choice of the best suited particles

Xing Sun^a, Mahmoud Gamal^b, Philipp Nold^c, Alaa Said^{b,d}, Indranath Chakraborty^a, Beatriz Pelaz^b, Franziska Schmied^e, Kerstin von Pückler^e, Jens Figiel^f, Ying Zhao^{g,h}, Cornelia Brendel^{c,f}, Moustapha Hassan^{g,h}, Wolfgang J. Parak^{a,b,i}, Neus Feliu^{a,g,*}

^a Center for Hybrid Nanostructures (CHyN), University of Hamburg, Hamburg, Germany

^b Department of Physics, Philipps-University of Marburg, Marburg, Germany

^c Department of Hematology, Oncology and Immunology, Philipps University Marburg, Marburg, Germany

^d Electronic and Nano Devices Lab, Faculty of Science, South Valley University, Qena, Egypt

^e Department of Veterinary Clinical Sciences, Clinic for Small Animal–Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Justus–Liebig–University Giessen, Giessen, Germany

^f Department of Diagnostic and Interventional Radiology, University Hospital Marburg, Philipps-University of Marburg, Marburg, Germany

^g Experimental Cancer Medicine (ECM), Department of Laboratory Medicine, Karolinska Institutet, Sweden

^h Clinical Research Centre (KFC), Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden

ⁱ CIC Biomagune, San Sebastian, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 November 2018

Accepted 4 December 2018

Keywords:

Nanoparticles

Cell Tracking

Stem Cell Labeling

Gold Nanoparticles

Biocompatibility

Contrast

Computed tomography

ABSTRACT

Nanoparticle (NP)-based cell imaging offers good potential for future diagnosis tools in medicine. Gold and iron oxide NPs can be used as contrast agents for imaging by computed tomography (CT) and magnetic resonance imaging (MRI), respectively. Thus, also cells which have been labeled with these NPs may be tracked. This may be important for *in vivo* tracking of administered or transplanted cells. In this work, we optimized the conditions to label stem cells and macrophages with a library of gold and iron oxide NPs of different sizes (5–100 nm core diameter) and shapes. We investigated the amount of NPs which can be delivered to different cells, as well as their related toxic effects, in relation to the physicochemical properties of the NPs. Our study revealed that in general, when cells are exposed to NPs at similar elemental concentration (e.g., Au or Fe), bigger NPs lead to higher internalized elemental amounts as compared to exposure with smaller sized NPs. While the exposure concentrations are limited concerning the onset of toxicity, bigger NPs lead to better labeling than small NPs, resulting in improved contrast for imaging with enhanced biocompatibility.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

For future nanoparticle (NP)-based diagnostics and therapeutics, *in vivo* delivery to the target site, such as tumors, is of importance. In general, for targeted delivery to tumors still sufficient accumulation of the NPs is a challenge [1]. Therefore, to overcome this limitation alternative strategies are under development. There are reports showing that stem cells as well as macrophages possess homing capabilities. After systemic administration, those cells could be found in inflamed, injured, and cancerous tissues [2–4]. Thus, these cells might act as delivery sys-

tems. They could be used for example as shuttle vehicles to deliver NPs to target sites such as zones of inflammation or tumors [4–6], potentially minimizing the clearance rate and toxicity associated to the NPs themselves. In the context of imaging, once reaching the target site, NPs can be used to provide contrast, e.g., superparamagnetic NPs for magnetic resonance imaging (MRI) [3,7–13], NPs composed of high atomic weight elements for computed tomography (CT) [14], plasmonic NPs for photoacoustic imaging [15,16], fluorescent NPs for fluorescence imaging [17,18], etc. In addition, the NPs from isotopes which do not naturally exist in the human body could be analyzed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) [19]. In the context of treatment, Choi et al. showed that mouse macrophages loaded with liposomal doxorubicin (LP-Dox) enabled a more effective therapy as compared to the conventional administration of the drug, thus suggesting that the cells were able to migrate to the target site and effectively delivered

* Corresponding author at: Center for Hybrid Nanostructures (CHyN), University of Hamburg, Hamburg, Germany.

E-mail address: nfeliu@physnet.uni-hamburg.de (N. Feliu).

the LP-Dox [20]. Also NPs once delivered by cells to the target site, could be used for other therapeutic purposes, e.g., photothermal heating [21,22], photodynamic therapy [23], etc.

Concerning regenerative medicine, a deeper understanding of the fate of transplanted cells, including their recruitment into the target site, or their interaction with the host environment after infusion, as well as additional studies underling their efficiency and potential benefits are needed [24]. However, one of the current limitation is to monitor the transplanted cells *in vivo*. There are several approaches used to detect cells after administration. The most common methods are (i) *ex vivo* techniques such as the real-time polymerase chain reaction (RT-PCR), histology, etc. (ii) the evaluation of transplanted cells in peripheral blood by conventional flow cytometry, and (iii) a variety of imaging systems which allow to monitor the cell homing *in vivo* [2]. Indeed, in the recent years, new imaging technologies have facilitated the possibility to noninvasively monitor the fate of transplanted cells *in vivo* [25]. However, there is still room for improvement and several limitations still remain a challenge. In this context, the current advances in nanotechnology allowed the development and production of distinct NP probes for cellular labeling, which enable the use of new imaging modalities [26]. To some extent, NPs could be used as a sensitive probe for labeling cells, with higher sensitivity than the current approaches, e.g., standard fluorescence labeling. Different NPs have been frequently used as contrast agents for cellular imaging as described above [27,28].

As outlined with the above-mentioned examples, NP labeling of cells offers applications in imaging, as well as in potential diagnosis and treatment. In the following the focus will be toward imaging, though the results of our study also apply to the other applications. As a rule of thumb, the more NPs have been loaded to a cell, the higher the contrast due to the NPs for imaging (or in case of treatment with photothermal therapy the higher the production of induced heat) will be. Thus, concerning contrast as many NPs as possible should be introduced *per cell*. However, the more NPs have been loaded *per cell*, the higher the probability is that this impairs the viability, proliferation, and homing capabilities of cells [19]. Concerning toxic effects, thus there should be as few NPs loaded *per cell* as possible. For this reason, the optimum for NP-loading has to be experimentally established. Conditions may be modified depending on the NPs' sizes and shapes, as endocytosis as well as toxicity may depend on these two parameters [29,30]. In order to achieve the same contrast with NP labeling below the toxic threshold, is it better to load cells with more smaller or fewer bigger NPs? While there is a whole body of work available in literature, a large comparative study outlining improved labeling protocols is missing, which is the objective of this report.

The goal of the present work is to find optimum conditions for stem cells and macrophage labeling with gold (Au) and iron oxide (IO) NPs toward CT and MRI imaging, respectively, while verifying that the NPs have no acute effect on cellular properties. In this case, optimum conditions refer to the maximum amount of NPs that can be loaded into cells without impairing their viability and proliferation. In the case of CT, the contrast is basically determined by the amount of elemental gold [31,32]. AuNPs of different sizes and shapes obviously contain different amounts of Au *per NP*. "Big" NPs contain more Au *per NP*, but the bigger the NPs, the fewer of them are incorporated by cells [29]. On the other hand, while "small" NPs are internalized to a higher amount, due to their enhanced surface-to-volume ratio also their toxicity (at the same amount of delivered elemental Au) maybe higher [33]. The question thus is which size of AuNPs are most suited for cellular labeling and what is the maximum amount of elemental Au that can be added to cells. For MRI contrast, due to superparamagnetic FeO_x-based NPs (SPIONs) is not directly related to the amount of delivered iron (Fe), but also in this case the more IONPs have been internalized by cells the higher the

contrast will be. The present work involves a comprehensive study, in which 6 types of AuNPs of different sizes and shapes (spherical → NP, rod-shaped → NR), together with Iohexol and BaSO₄ as standard contrast agents (CAs) for CT, and 2 types of IONPs of different sizes, together with Gadodiamide as standard CA for MRI, were used to label three different types of stem cells and one macrophage cell line. Concentration-dependent uptake of NPs, exocytosis, cell viability, and proliferation were measured after 24 h and/or up to 72 h of exposure of NPs in serum supplemented medium. For each combination, the maximum amount of elemental Au or Fe that can be introduced to cells without impairing cell viability was determined, thus indicating the best labeling conditions. Comparison of results between the 4 different types of cells, three primary stem cell types, from different species and sources, human, horse, and dog which are abbreviated as MSCs throughout the manuscript, as well as murine alveolar macrophages (MHS), allows for a solid database to discuss generality of the results. Finally, CT and MRI imaging capabilities of NPs, CAs and NP-labeled cells are shown. Based on the maximum amount of elemental Au or Fe that can be incorporated *per cell* (uptake studies as measured by ICP-MS) and the CT and MRI calibration curves, the maximum contrast *per cell* for imaging could be also calculated.

2. Results and discussion

A library of AuNPs and IONPs of different sizes and shapes were synthesized exclusively for this study, adopting protocols from previous reports [34,35], see Fig. 1. The synthesis details and the full characterization of the NPs is provided in Supplement Information (SI, Section SI-I and SI-II). Cells were exposed to the NPs, whereby the amount of NPs which reach the surface of cells, which is a requirement for subsequent endocytosis, depends on the colloidal properties of the NPs [36]. In the following the NP dose is provided in terms of mass concentrations C_{Au} and C_{Fe} [mg/mL] of elemental Au and Fe for the AuNPs and IONPs, respectively. The corresponding molar NP concentrations are provided in SI [35].

The amount of Au and Fe found *per cell* ($m_{Au/cell}$ and $m_{Fe/cell}$) after exposing primary human, dog, and horse MSCs as well as MHS for 4 h, 24 h, and 48 h to AuNPs and IONPs at concentration C_{Au} and C_{Fe} , respectively, was determined by ICP-MS and is shown in Fig. 2 and Fig. SI-VII.1–9. In all cases concentration-dependent uptake was observed, which increased upon increasing NP concentration. Only in case of very high NP uptake, such as for 100 nm diameter spherical AuNPs, saturation effects were observed, in particular in the case of horse MSCs. The mass-concentrations C_{Au} and C_{Fe} of elemental Au and Fe form a more different metrics than the NP concentrations, as with increasing diameter each NP will comprise more atoms [30]. Thus, in order to account for different metrics and different representation, the same uptake data are plotted *versus* the NP concentrations C_{AuNP} and C_{IONP} in SI (section SI-VII). Due to presentation issues, the data shown in Fig. 2, which are the mean values of 3 independent experiments, are shown without error bars. The full data set for all experiments is provided in SI (section SI-VII). Our results indicate that the order of uptake for all different types of NPs was similar for the 4 different types of cells. In all cases at the same exposure concentration, 100 nm diameter spherical AuNPs yielded the most Au *per cell*, and 25 nm diameter spherical AuNPs delivered the lowest amount of Au *per cell* (see Table SI-VII.2). In general, at equal exposure conditions (in terms of Au concentration (C_{Au})), the bigger spherical AuNPs are capable of delivering more Au to cells as compared to the smaller sized AuNPs. Indeed, 40 and 100 nm rod shaped AuNPs (AuNRs) had lower uptake than the spherical NPs. As AuNRs with a length corresponding to the diameter of spherical AuNPs have a lower volume and thus mass *per NP* as spherical NPs, this is most likely due to mass-dependent

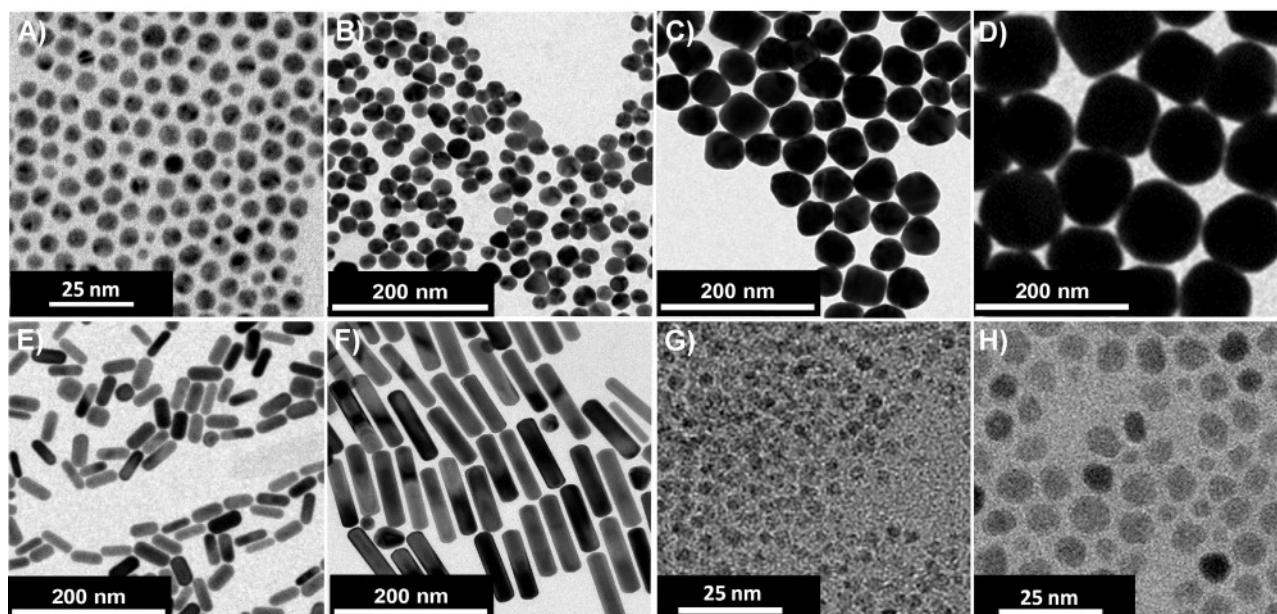


Fig. 1. (A) Transmission electron microscopy (TEM) images of the NP library used in the study: (A) 5 nm AuNPs, (B) 25 nm AuNPs, (C) 50 nm AuNPs, (D) 100 nm AuNPs, (E) 40 nm AuNRs, (F) 100 nm AuNRs, (G) 4 nm IONPs, and (H) 8 nm IONPs.

sedimentation [36] and not the size-dependent endocytosis [29]. Colloidal stability studies of spherical AuNPs in milliQ water and cell media supplemented with fetal bovine serum (FBS) were performed up to 72 h incubation, see Fig. 3A and SI (section II.4, Figs. SI-II.4.1.–4.3). As expected, the data indicated that 100 nm diameter spherical AuNPs followed by 50 nm diameter spherical AuNPs are the NPs with the highest percentage of sedimentation observed under our experimental conditions, which coincides with the highest amount of internalized Au found *per cell*, see Fig. 3B and C. Also for the IONPs the bigger NPs lead to (slightly) more internalized Fe *per cell*. In fact, enhanced uptake of big NPs in 2D cultures is driven by the local NP concentration at the cell surface, which depends on the sedimentation of the NPs, see Fig. 3D [36]. See SI for detailed information. It is important to have in consideration that NP suspensions may be subject to physicochemical transformations and thus the final NP dose delivered to the cells may be affected [37].

The uptake of NPs was time dependent. In general, both the NPs and CAs are internalized by cells in a time and concentration dependent manner. The uptake data after 4 h and 48 h of NP exposure, as well as CAs are shown in SI (section II.4). Indeed, for the desired doses, the uptake of NPs is higher than for the commercial CAs, even at lower doses (*i.e.* $C_{NP} \ll C_{CAs}$). For all the doses and time points evaluated, the human MSCs appear to internalize NPs at higher extent as compared to the other types of MSCs. On the other hand, for almost all conditions, the uptake of NPs by MHS macrophages is much higher than the uptake by MSCs. This is most probably due to the phagocytic properties of the macrophages MHS cells [38].

There are several factors influencing the labeling efficiency of cells. Living cells are dynamic entities, thus the NPs concentration within the cell will be altered by several cellular processes. Critical factors affecting the NP concentration within a cell will be the cell cycle, exocytosis, proliferation rate of the cells, *etc.*, see Fig. 4A [39,40]. In fact, we observed a variation in uptake concerning the 4 different types of cells (*cf.* Fig. 2, Section SI-VII). In the same exposure condition for the MSCs, the most Au was found in human MSCs, while the lowest in horse MSCs. Apart from detailed “biological” differences between different cell types, uptake of NPs by cells may be affected by the surface area of cells and by their proliferation rate,

as well as by other factors. For being delivered to cells, the NPs first have to come into contact with the cell surface, before they can be endocytosed. Therefore, one may hypothesize that the bigger the surface area of cells, the more NPs are likely to be internalized *per cell*. Upon cell division, incorporated NPs are distributed between the daughter cells [39], so the amount of internalized NPs *per cell* is diluted [41]. Thus, one may hypothesize that cells with a high proliferation rate thus should have less NPs *per cell* internalized. In order to probe both hypotheses, for each of the 4 cell types, their cross section area A_{cell} and their average time interval to cell division $T_{1/2,cell}$ were experimentally determined, see Table 1, Fig. 4B–D, and SI. Results show that, the human MSCs have the largest surface area A_{cell} and cell volume V_{cell} , followed by the dog MSCs, horse MSCs and MHS macrophages.

In general, the MHS macrophages whose cross-section surface ($A_{cell,sus}$) is around 2.7 times lower than the one of the human MSCs, have a higher NP uptake rate. This is probably due to their phagocytic capacity in contrast to the MSCs. Within the 3 different types of MSCs indeed the amount of NPs found inside each cells depends on the cellular cross-section area. In order to visualize this the amount of Au found *per cell* ($m_{Au/cell}$) can be normalized to the cell volume ($m_{Au/cell}/V_{cell}$), see Fig. 4E and F and SI §VII. The $m_{Au/cell}$ data indicate for example, that in the case of 100 nm AuNPs dog and horse MSCs incorporate much less AuNPs *per cell* than human MSCs (Fig. 3E). However, when normalizing to the cell volume, the $m_{Au/cell}/V_{cell}$ data indicate that this is in part due to the fact that the dog and horse MSCs are smaller than the human MSCs. We clearly need to state that there is no direct linear correlation between the amount of internalized NPs and the cross section area of cells, but that in the present data set MSCs with bigger surface often incorporate more NPs *per MSCs* than those with smaller surface area. As stated above, for dividing cells, the labeling efficiency or internalization of NPs also should be normalized to cell growth or proliferation rate, as the NPs are diluted upon each cell division. In Fig. 4G and H and SI §VII normalization concerning the proliferation rate is shown, in which the normalized amount of internalized NPs is given as $m_{Au/cell}/T_{1/2,cell}$. While again there is no direct correlation, data show that in MSCs faster proliferation leads to a lower mean number of internalized NPs *per cell*. At least part of the different uptake

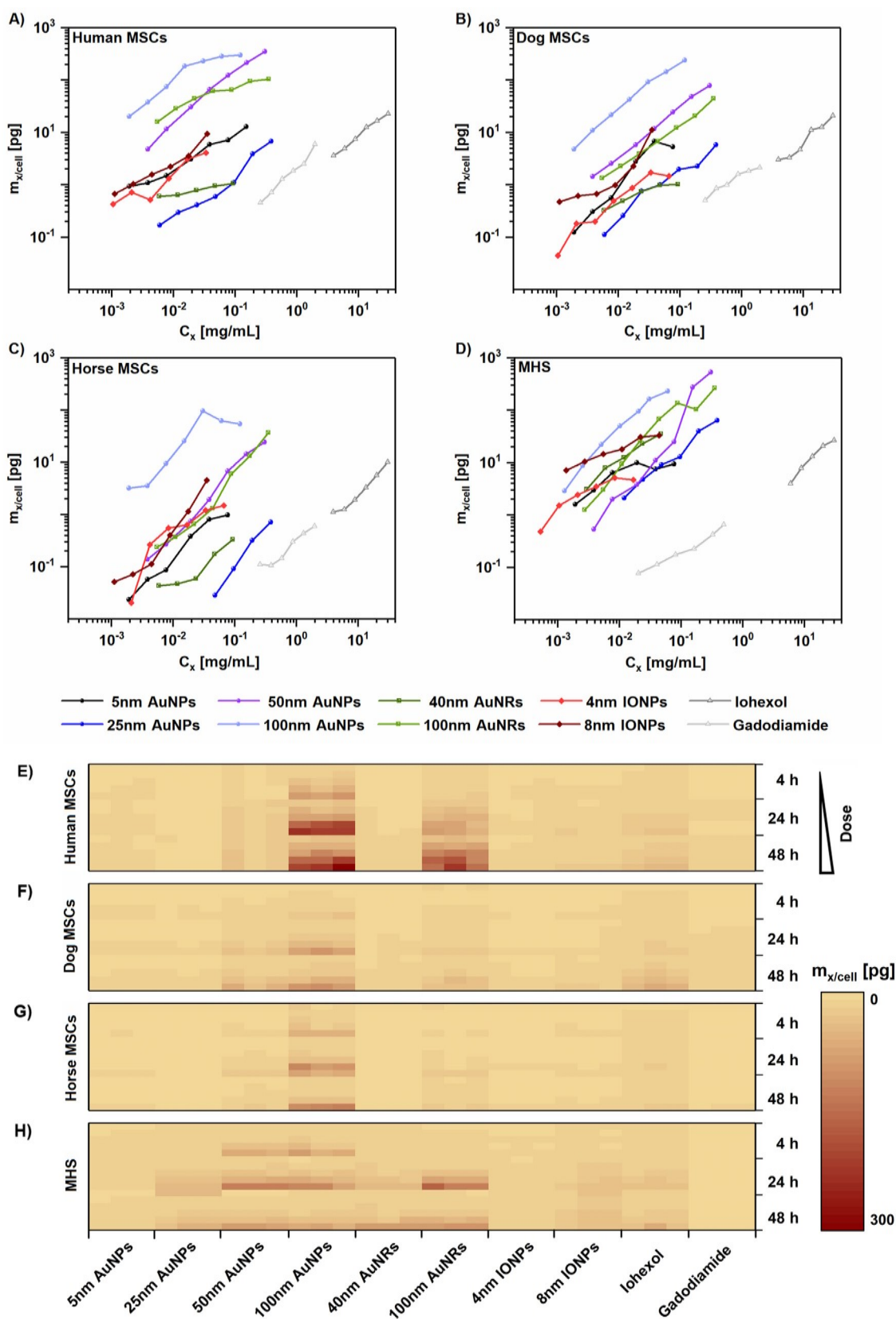


Fig. 2. Amount of elemental Au ($m_{x/cell} = m_{Au/cell}$) and Fe ($m_{x/cell} = m_{Fe/cell}$) found in MSCs and MHS macrophages after 24h exposure to AuNPs and IONPs at different Au ($C_x = C_{Au}$) and Fe ($C_x = C_{Fe}$) concentrations, respectively. As control, cells were exposed to Iohexol and Gadodiamide at different I ($C_x = C_I$) and Gd ($C_x = C_{Gd}$) concentrations, and the amount of incorporated iodine ($m_{x/cell} = m_{I/cell}$) and gadolinium ($m_{x/cell} = m_{Gd/cell}$) per cell was determined, respectively. Data are shown for: (A) human MSCs, (B) dog MSCs, (C) horse MSCs, and (D) MHS macrophages. (E–H) Heat map representing the internalization studies of different cells conducted at 4 h, 24 h and 48 h (same data as displayed in A–D). The amount of incorporated NPs/contrast agents was determined as mass of elemental Au, Fe, I, Gd per cell by ICP-MS. The exposure is quantified as mass of added elemental Au, Fe, I, Gd per volume of solution, and not as mass of added NPs (which for example in case of IONPs also comprises the mass of oxygen and the surface coating/CAs). The results represent the mean value from minimum three independent experiments using cells from different donors or different cell passages. The error bars are omitted for clarity, see SI.

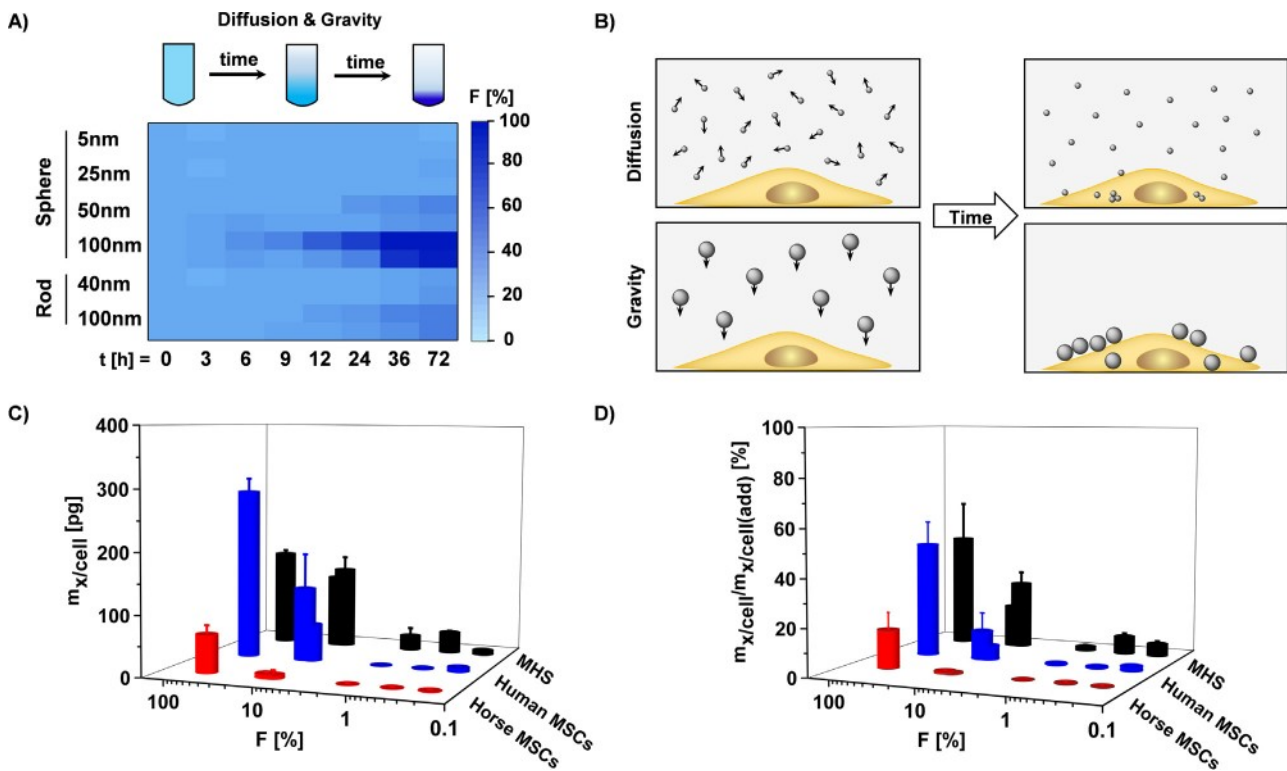


Fig. 3. (A) Sedimentation rate of the NPs dispersed in milliQ and complete cell media containing 10% FBS over time, as quantified by the fraction F [%] of NPs which from an originally dispersed solution has sedimented after a time t to the bottom of the tube ($n=3$). (B) Scheme illustrating the effects of basic colloidal properties of NPs on their cellular uptake. Knowing the colloidal properties of the NPs allows to consider the amount of NPs which will reach the cell surface in 2-dimensional (2D) *in vitro* cultures [36]. (C) Amount of internalized Au per cell ($m_{x/cell} = m_{Au/cell}$) in dependence of the fraction F of sedimented NPs. (D) Amount of internalized Au per cell ($m_{x/cell} = m_{Au/cell}$) normalized to the amount of Au which has been added to cells $m_{x/cell(added)} = C_x \cdot V_{medium} / N_{cell}$, whereby $C_x = C_{Au}$ is the concentration of Au in the AuNP solution of volume V_{medium} which has been added to N_{cell} cells. From left to right, bars representing the 100 nm AuNPs, 50 nm AuNPs, 100 nm AuNRs, 40 nm AuNRs, 25 nm AuNPs and 5 nm AuNPs, respectively. The results represent the mean value from three independent experiments using cells from different donors or different cell passages. See the SI for details.

Table 1

Basic characteristics of the investigated cell types comprising the cross section area A_{cell} as determined from suspended (“sus”) and attached (“att”) cells, the cell volume V_{cell} , and the average time to cell division $T_{1/2,cell}$. Here V_{cell} is obtained from the $A_{cell,sus}$ data with the approximation that suspended cells are spheres. Consequently, the radius of suspended cells was experimentally determined and volume was obtained.

	Human MSCs	Dog MSCs	Horse MSCs	MHS
$A_{cell,sus}$ [μm^2]	427 ± 96	310 ± 42	270 ± 44	158 ± 40
$A_{cell,att}$ [μm^2]	4740 ± 1431	2650 ± 784	846 ± 156	254 ± 85
V_{cell} [μm^3]	6650 ± 710	4150 ± 200	3340 ± 220	1500 ± 200
$T_{1/2,cell}$ [h]	81 ± 7	41 ± 5	16 ± 2	33 ± 6

results in-between different MSCs thus can be ascribed to basic parameters such as cell cross-section area and proliferation rate.

While uptake is governed by endocytosis, the amount of internalized NPs is also influenced by exocytosis, which counteracts endocytosis [42–44]. Thus, NP retention studies are an important factor to be evaluated. We found that for all cells studied, the exocytosis rate of the small NPs was higher than the exocytosis rate of NPs of bigger size, *i.e.* results were independent of the exposure dose, internalization rate and proliferation, see Fig. 5B and C and Fig. SI-VIII.3. Furthermore, enhanced exocytosis was found in those cells which divided faster, *i.e.* cells with lower $T_{1/2}$ (see Fig. 5A, and Fig. SI-VIII.1 and VIII.3). The exocytosis rate was not directly depending on the percentage of internalized NPs and cell proliferation ($T_{1/2,cell}$). The extend of exocytosis was rather associated to the size and the exposure dose of the NPs (see Fig. 5). A summary of the uptake study pointing out the influence of the different parameters is shown in Fig. 5B and C.

While so far, the loading of cells with NPs was discussed, high NP doses of internalized NP may also impair cells. Thus, in addition, further biocompatibility studies were conducted. For the cells exposed to the different NPs and CAs the cell viability V was measured after 24 h (see Fig. 6), 48 h, and 72 h (see SI) by the standard resazurin assay [19,45]. Exposure to CdCl_2 was used as positive control. Data indicate that for the used NP concentrations (at higher concentrations some of the NPs are no longer colloidal stable) most NPs and CAs did not reduce cell viability in MSCs (*cf.* Fig. 6). Analysis of surface markers also demonstrated that the human MSCs kept their phenotype after exposure to NPs for 24 h (see SI section VI). In contrast, concentration-dependent reduction of viability was observed for the macrophage cell line under high exposure conditions. Viability was as expected more impaired after 48 h or 72 h exposure than after 24 h (see SI). There is an earlier onset of reduction in cell viability in terms of mass concentration C_x for the IONPs than for the AuNPs. This, however, is partly due to the metrics, as one atom of iron has less mass than one atom of Au ($M_{Fe}/M_{Au} = (55.845 \text{ g/mol}) / (196.967 \text{ g/mol}) = 0.283$). Reduction of cell viability upon exposure to rod-shaped AuNRs of 100 nm length may be due to the fact that their internalization to cells is high and that they had been initially grown in toxic cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) [46], which maybe has not been completely removed before the polymer surface chemistry was applied [47].

Also, the proliferation of the different cells upon exposure for 24 h (see Fig. 7) to the NPs and CAs was recorded. As expected, longer incubation time had more effects on reducing the proliferation. In general, at the same exposure dose, MHS cells and human MSCs are more sensitive than the dog and horse MSCs to

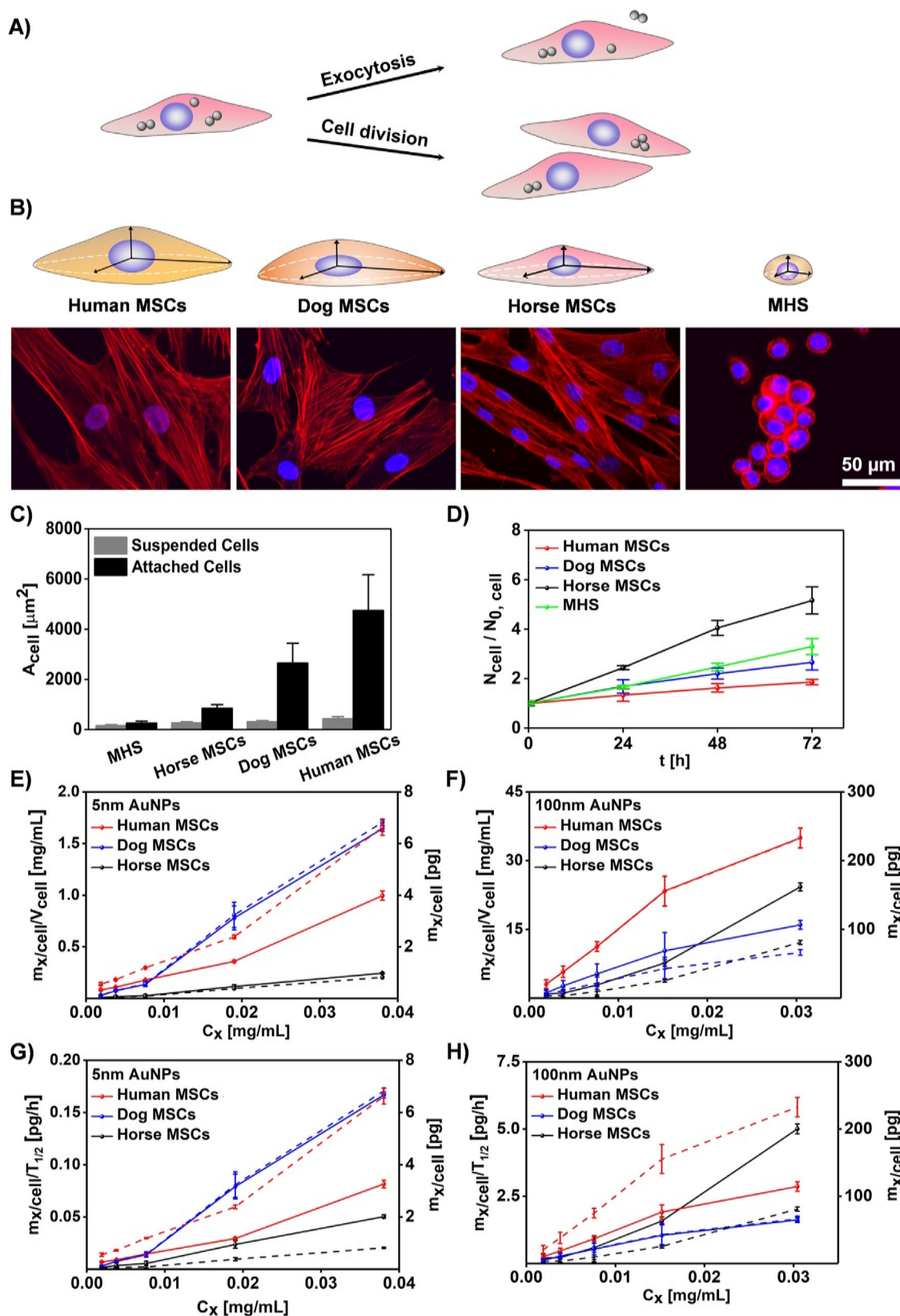


Fig. 4. Overview of factors influencing the NP labeling efficiency of cells. (A) Scheme illustrating the effects of cell division and exocytosis on the retention of NPs within a cell. (B) Sketch of the morphology of the MSCs and MHS cells, together with fluorescence microscopy images of stained cytoskeleton and nuclei of cells. The scale bar corresponds to 50 μm . The scale bar is the same for all the images. (C) Cross-section area of adherent and trypsinized (i.e. suspended) cells (A_{cell}). (D) Cell division as described by the time-dependent number of cells in culture N_{cell} versus the initial amount of seeded cells $N_{0,\text{cell}}$ ($N_{\text{cell}}/N_{0,\text{cell}}$). (E and F) Amount of elemental Au ($m_{\text{x}/\text{cell}} = m_{\text{Au}/\text{cell}}$) found in MSCs after 24 h exposure to 5 nm and 100 nm AuNPs at different Au ($C_{\text{x}} = C_{\text{Au}}$) exposure concentrations. The uptake results are expressed in terms of Au per cell ($m_{\text{x}/\text{cell}}$ [pg], represented as slashed lines) and normalized to the respective cell volume ($m_{\text{x}/\text{cell}}/V_{\text{cell}}$ [mg/mL], represented as solid lines). (G and F) Amount of elemental Au ($m_{\text{x}/\text{cell}} = m_{\text{Au}/\text{cell}}$) found in MSCs after 24 h exposure to 5 nm and 100 nm AuNPs at different Au ($C_{\text{x}} = C_{\text{Au}}$) exposure concentrations. The uptake results are expressed in terms of Au per cell ($m_{\text{x}/\text{cell}}$ [pg], represented as slashed lines) and normalized to the respective proliferation time ($m_{\text{x}/\text{cell}}/T_{1/2,\text{cell}}$ [pg/h], represented as solid lines).

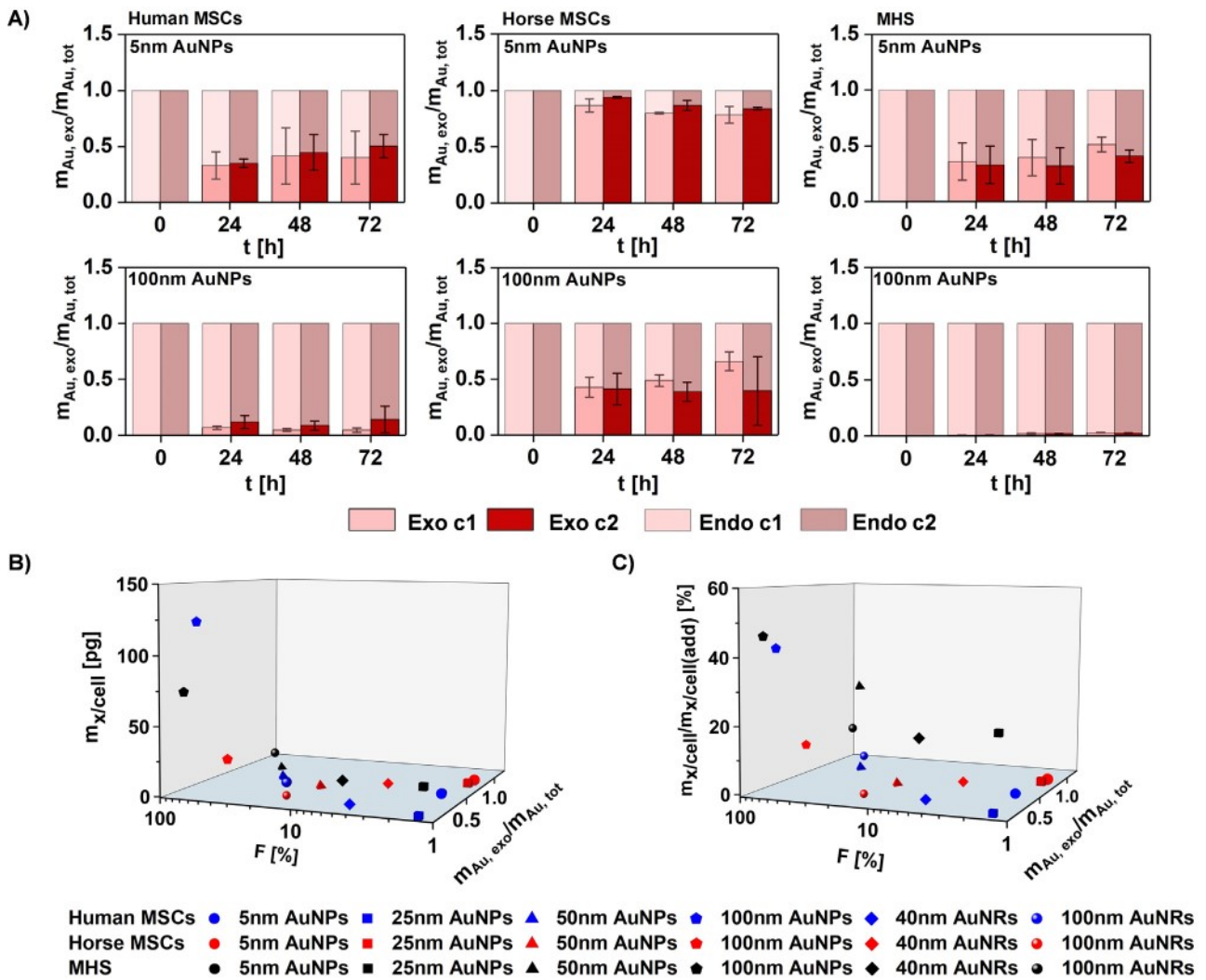


Fig. 5. (A) Percentage of exocytosed for 5 nm AuNPs and 100 nm AuNP in Human MSCs, Horse MSCs, and MHS macrophages expressed as $m_{Au,exo}/m_{Au,tot}$. $m_{Au,tot}$ is the total amount of internalized Au directly after removal of AuNPs from the extracellular medium. Upon exocytosis this is split into the amount of Au which remains inside cells (m_{Au}) and the amount of exocytosed Au ($m_{Au,exo}$): $m_{Au,tot} = m_{Au} + m_{Au,exo}$. The C_{AuNP} values used in the experiment are summarized in the SI (Table SI-VIII.1): 5 nm AuNPs $c_1 = 50$ nM, $c_2 = 100$ nM, 100 nm AuNPs $c_1 = 1.6$ pM, $c_2 = 3.3$ pM. Endocytosis values are named “Endo” and exocytosis values “Exo”. Results are obtained from a minimum three independent experiments using cells from different donors or different cell passages. (B and C) Compilation of uptake results. The AuNP concentrations C_{AuNP} used for the data points presented here are summarized in the SI (Table SI-VIII.1): 5 nm AuNPs: 100 nM, 25 nm AuNPs: 0.5 nM, 50 nm AuNPs: 0.5 nM, 100 nm AuNPs: 3.3 pM, 40 nm AuNRs: 0.5 nM, and 100 nm AuNRs: 0.12 nM.

the exposure of NPs and CAs. In agreement with a previous study, proliferation is a more sensitive indicator than viability to the onset of cytotoxic effects of NPs [48]. Our results indicate that at similar elemental exposure dose C_x [mg], small spherical AuNPs are more toxic than big spherical AuNPs. However, the 100 nm AuNPs impair macrophages but not human MSC (probably due to their high phagocytic capacity). In addition, for AuNRs, at similar dose, bigger AuNRs impair proliferation more than smaller AuNRs. Furthermore, IONPs showed similar toxicity as the AuNPs of similar size. As the visualization of results such as cell viability, proliferation, uptake, etc. depends on the exposure metrics [49], in SI all the metrics used in this study and the corresponding conversions are provided.

For cellular labeling, the amount of intracellular Au or Fe should be as high as possible, but without impairing cells. The higher the exposure concentration C_x , the more label inside cells ($m_x/cell(C_x)$), see Fig. 2. On the other hand, the higher the exposure concentration, the more the cell proliferation $P(C_x)$ may be reduced (the same is true for viability, but proliferation is a more sensitive indicator). Thus, in order to find the optimum labeling conditions both curves

were convoluted. In Fig. 8 the $m_x/cell(C_x) \times P(C_x)$ versus C_x data are shown. The data typically lead to a maximum-type curve. For low exposure concentrations, still more NPs can be incorporated and thus $m_x/cell(C_x) \times P(C_x)$ raises. For high exposure concentrations, there is an onset of toxicity and thus $m_x/cell(C_x) \times P(C_x)$ declines. The maximum of the $m_x/cell(C_x) \times P(C_x)$ curve gives the exposure concentration C_x^* at which the maximum amount of Au or Fe can be loaded to the cells without impairing them. From Fig. 2 then the maximum mass of delivered Au or Fe can be determined as $m_x/cell(C_x^*)$. In some cases, the $m_x/cell(C_x) \times P(C_x)$ curves are steadily raising. In this case, it was not possible to reach exposure concentrations at which proliferation starts to be reduced (due to onset of agglomeration of the NPs). The optimum exposure concentration C_x^* then is the maximum concentration which was possible to be added to the cells. The obtained results are enlisted in Table 2.

Overall, from our results we could conclude that the spherical 50 nm and 100 nm AuNPs are the best NP candidates for labeling MSCs and MHS cells with regard to labeling efficacy, exocytosis, viability, and maintenance of proliferation. Indeed, similar exposure doses of 100 nm AuNPs (in terms of C_x [mg/mL]) lead to higher

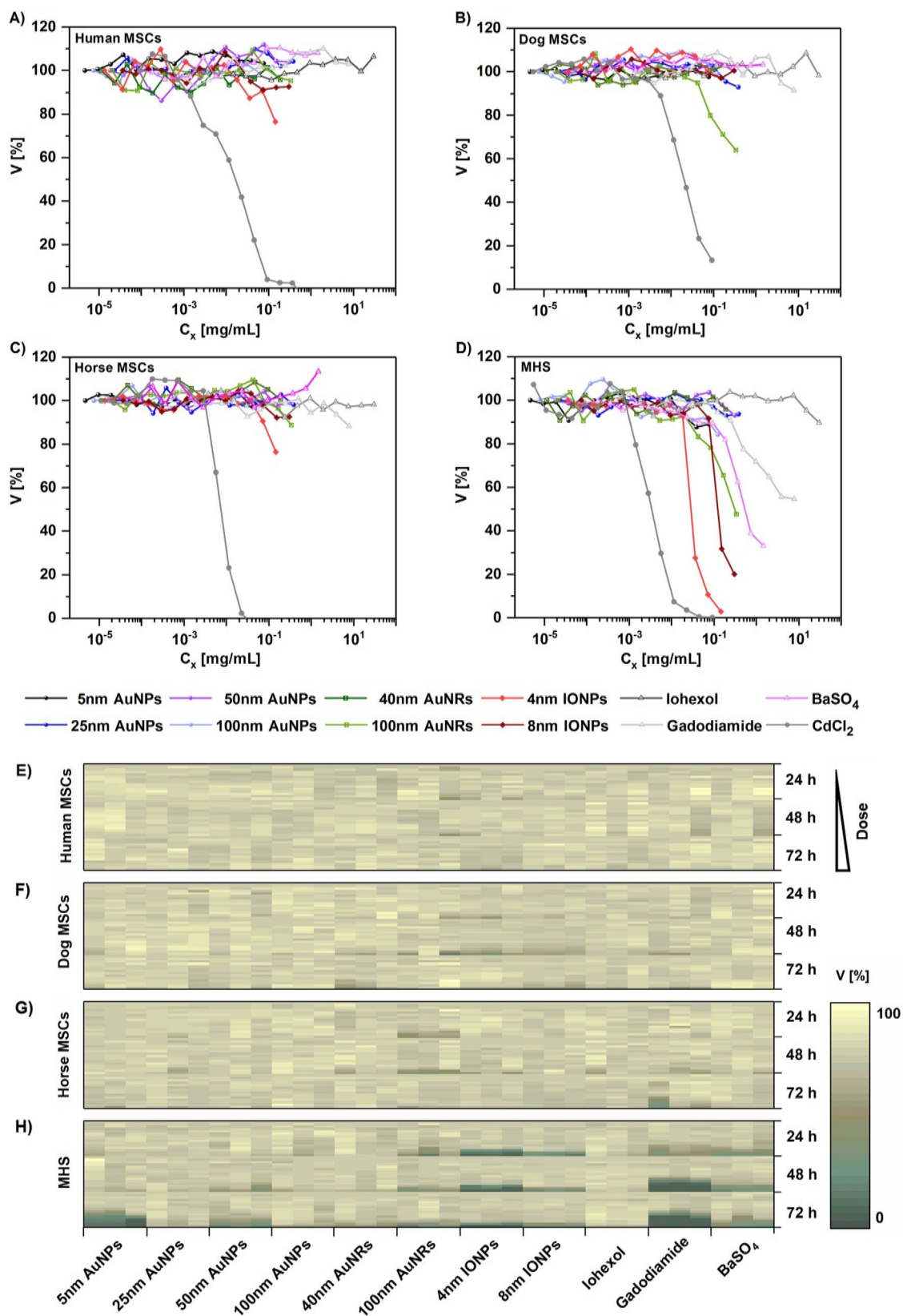


Fig. 6. Cell viability V of MSCs and MHS macrophages after 24 h exposure to AuNPs and IONPs at different Au ($C_x = C_{Au}$) and Fe ($C_x = C_{Fe}$) concentrations, respectively. As control, cells were exposed to Iohexol, Gadodiamide, BaSO₄, and CdCl₂ at different I ($C_x = C_I$), Gd ($C_x = C_{Gd}$), Ba ($C_x = C_{Ba}$), and Cd ($C_x = C_{Cd}$) concentrations, respectively. Cell viability V of (A) human MSCs, (B) dog MSCs, (C) horse MSCs, and (D) MHS macrophages. (E–H) Heat map representing all the cell viability studies conducted at 24 h (data are the same as shown in A–D), 48 h, and 72 h. Results are presented as percent cell viability V [%] as mean from minimum three independent experiments using cells from different donors or different cell passages. Error bars omitted for clarity.

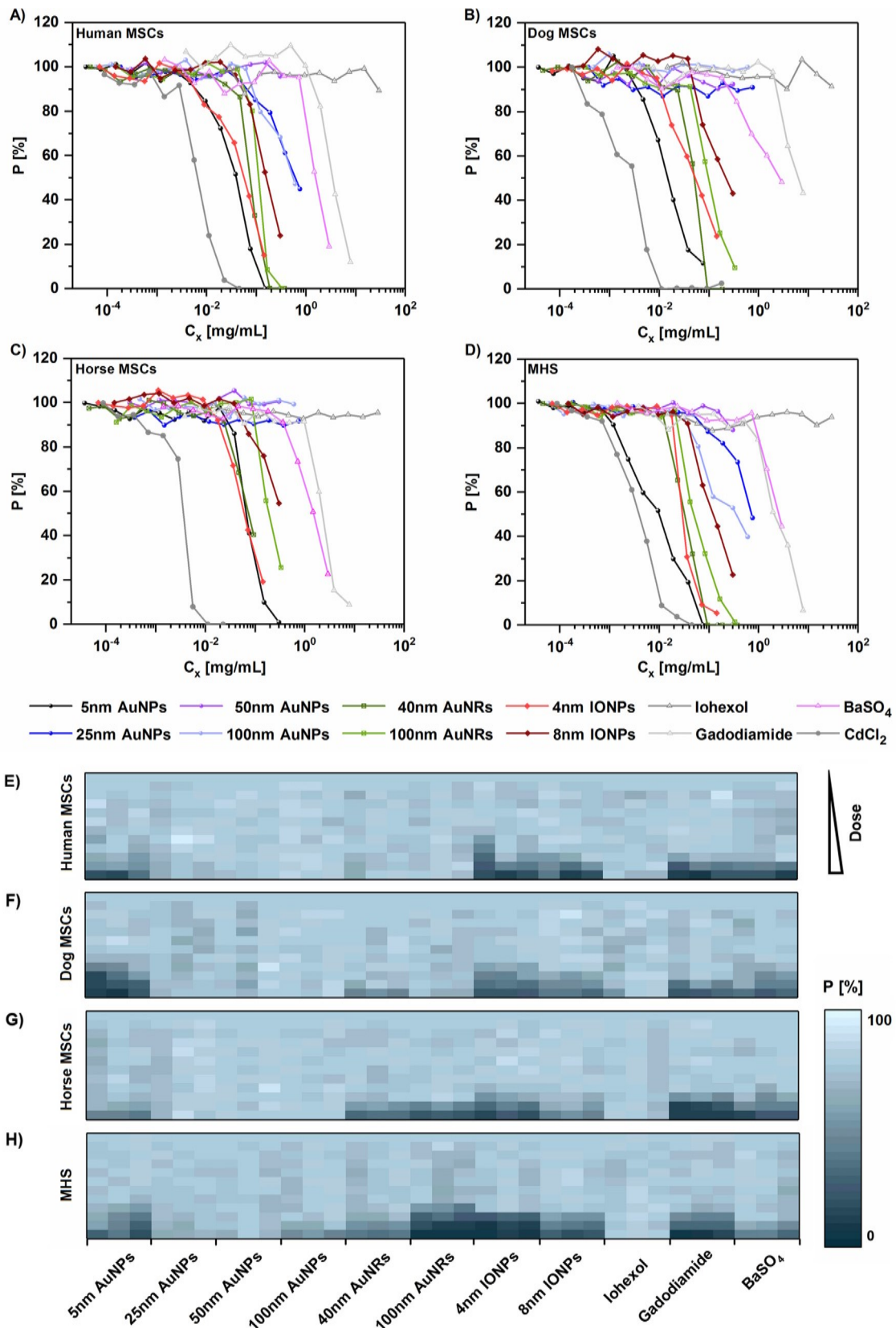


Fig. 7. Cell proliferation P of MSCs and MHS macrophages after 24 h exposure to AuNPs and IONPs at different Au ($C_x = C_{Au}$) and Fe ($C_x = C_{Fe}$) concentrations. As control cells were exposed to Iohexol, Gadodiamide, BaSO₄, and CdCl₂ at different I ($C_x = C_I$), Ba ($C_x = C_{Ba}$), Gd ($C_x = C_{Gd}$), and Cd ($C_x = C_{Cd}$) concentrations, respectively. Cell proliferation P of (A) human MSCs, (B) dog MSCs, (C) horse MSCs, and (D) MHS macrophages. (E–H) Heat map representing all the proliferation studies conducted at 24 h (E), corresponding to the same data as shown in A–D. Results are presented as mean values from a minimum of three independent experiments using cells from different donors or different cell passages. Error bars omitted for clarity.

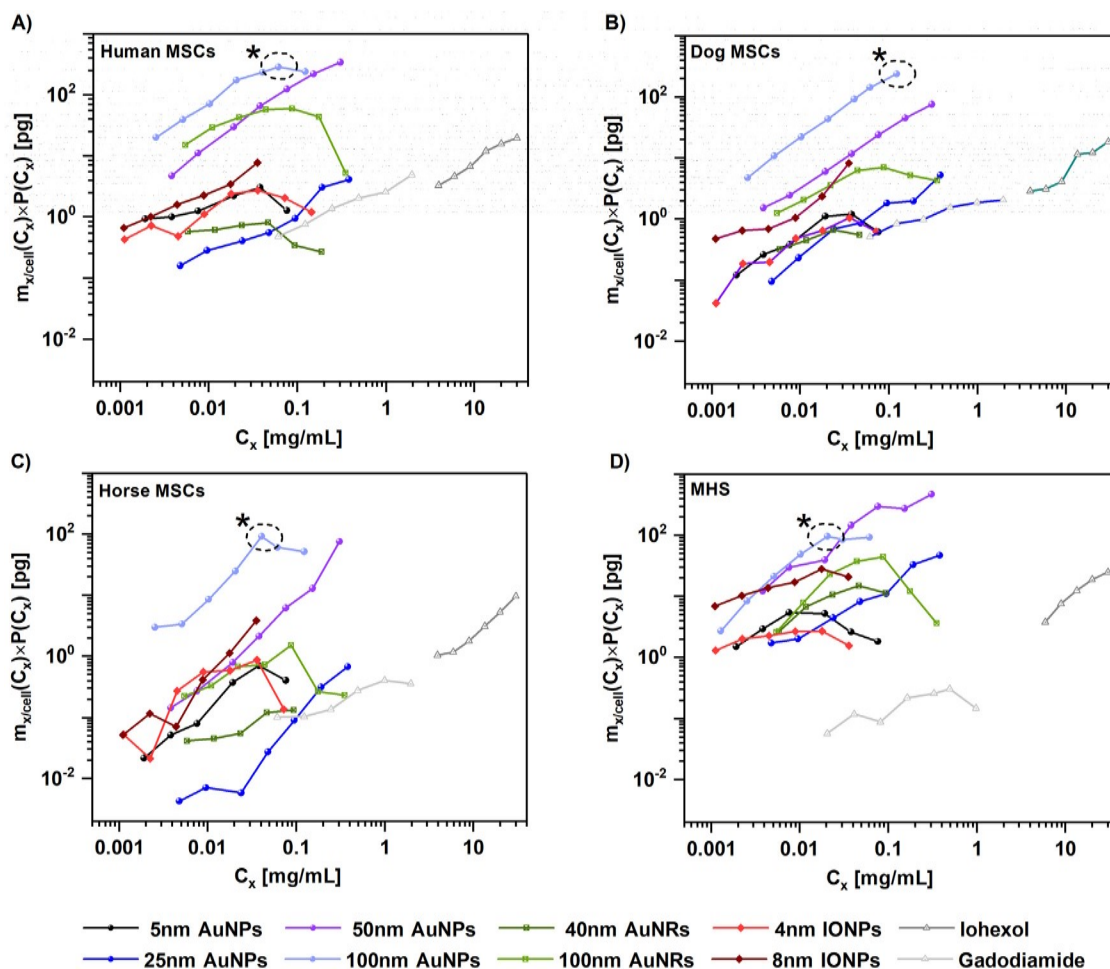


Fig. 8. Amount of incorporated Au, Fe, I, and Gd ($m_{x/cell}(C_x)$ data from Fig. 2) multiplied with the cell proliferation ($P(C_x)$ data from Fig. 7) after 24 h exposure of cells to AuNPs and IONPs at different Au ($C_x = C_{Au}$) and Fe ($C_x = C_{Fe}$) concentrations, respectively. As control cells were exposed to Iohexol and Gadodiamide at different I ($C_x = C_I$) and Gd ($C_x = C_{Gd}$) concentrations, respectively. (A) Human MSCs, (B) dog MSCs, (C) horse MSCs, and (D) MHS macrophages. For the 100 nm AuNPs the optimum exposure concentration C_x^* is indicated with a black star. Results were obtained from a minimum three independent experiments using cells from different donors or different cell passages.

amounts of intracellular Au $m_{x/cell}(C_x)$ as compared with other AuNPs. This result is consistent for all the different MSCs. In the case of MHS cells 50 nm AuNPs yield to the best labeling, because MSC seem to tolerate the 100 nm AuNPs better than the MHS. In terms of IONPs our results indicate that with 8 nm IONPs more Fe can be delivered to cells than with 4 nm IONPs.

With the data provided in Table 2, the maximum contrast which can be achieved with the AuNPs and IONPs used in our study for CT and MRI, respectively, can be predicted by using a calibration curve (see Table 3). In case of CT contrast directly depends on the amount of Au (or I or Gd) and is given in terms of normalized attenuation μ of X-rays measured in Hounsfield units [HU] [32]. For obtaining a calibration curve, the contrast of test solutions with different concentrations of $H AuCl_4$, the different AuNPs, and the CAs was measured in agarose matrixes, see Fig. 9A. The data show that the CT contrast of AuNPs in fact depends on the elemental concentration of gold C_{Au} , as the contrast of all AuNPs follows the calibration curve of $H AuCl_4$. Contrast with CT could then be also observed with cells which have been labeled with AuNPs (cf. Fig. 9B, and SI). Also for the IONPs calibration curves in agarose matrixes were recorded with MRI, see Fig. 9C. Data show the concentration-dependent T_2 MRI contrast. Contrast with MRI could also be observed with cells that have been labeled with IONPs (cf. Fig. 9D and SI).

With this information, the maximum contrast for cellular labeling can be predicted. The maximum mass of internalized Au per

cell divided by the cell volume V_{cell} gives the mean Au concentration inside a cell $m_{x/cell}(C_x^*)/V_{cell}$. The experimental values are listed in Table 2. Using the calibration curve of Fig. 9B, which relates CT contrast with Au concentrations, the CT contrast of the labeled cells μ^* can be calculated, see Table 3. In the case of IONPs the same approach using the calibration curve of Fig. 9D can be used to predict the maximum T_2 MRI contrast I^* for IONP labeled cells, see Table 3. In fact, in both cases (CT and MRI) the contrast recorded with phantoms of labeled cells (star symbols in Fig. 9B and D) match well the predicted values.

3. Conclusions

Here we show that stem cells and macrophages can be successfully labeled with AuNPs and IONPs. We illustrated that the concentration of NPs within a cell depends on the nature of the NPs, their stability in biological media, cell area, cell type, proliferation, exocytosis rate of the cells, etc. We found that bigger AuNPs such as the 100 nm AuNPs (for MSCs) and 50 nm AuNPs (for MHS) used in our study allow for optimizing the amount of intracellular Au at which no significant reduction in cell proliferation occurs. Consequently, higher CT contrast can be achieved by labeling cells with bigger (i.e. 100 nm) AuNPs than with smaller (i.e. 5 nm) AuNPs. Importantly, higher labeling efficiency of cells could be achieved

Table 2

Maximum exposure concentration C_x^* for the different NPs and CAs as taken from Fig. 7, together with the corresponding delivered mass $m_{x/cell}(C_x^*)$ taken from Fig. 2. $X = Au, Fe, I, Gd$. The NP concentration within the cells is expressed as $m_{x/cell}(C_x^*)/V_{cell}$ [mg/mL]. V_{cell} is taken from Table 1.

Sample	Human MSCs			Dog MSCs		
	C_x^* [mg/mL]	$m_{x/cell}(C_x^*)$ [pg]	$m_{x/cell}(C_x^*)/V_{cell}$ [mg/mL]	C_x^* [mg/mL]	$m_{x/cell}(C_x^*)$ [pg]	$m_{x/cell}(C_x^*)/V_{cell}$ [mg/mL]
5 nm AuNPs	3.80×10^{-2}	5.93	8.91×10^{-4}	3.80×10^{-2}	6.82	1.64×10^{-3}
25 nm AuNPs	0.38	6.79	1.02×10^{-3}	0.38	5.79	1.40×10^{-3}
50 nm AuNPs	0.30	354.11	5.33×10^{-2}	0.30	79.13	1.90×10^{-2}
100 nm AuNPs	0.06	286.28	4.31×10^{-2}	0.06	241.20	5.81×10^{-2}
40 nm AuNRs	0.05	0.94	1.42×10^{-4}	0.05	0.75	1.80×10^{-3}
100 nm AuNRs	0.12	64.85	9.75×10^{-3}	0.12	12.38	2.98×10^{-3}
4 nm IONPs	0.02	4.10	6.17×10^{-4}	0.02	1.72	4.16×10^{-4}
8 nm IONPs	0.03	9.43	1.42×10^{-3}	0.03	11.19	2.70×10^{-3}
Iohexol	30.02	23.06	3.47×10^{-3}	30.02	20.95	5.05×10^{-3}
Gadodiamide	0.98	2.52	3.70×10^{-4}	0.98	1.84	4.40×10^{-3}

Sample	Horse MSCs			MHS		
	C_x^* [mg/mL]	$m_{x/cell}(C_x^*)$ [pg]	$m_{x/cell}(C_x^*)/V_{cell}$ [mg/mL]	C_x^* [mg/mL]	$m_{x/cell}(C_x^*)$ [pg]	$m_{x/cell}(C_x^*)/V_{cell}$ [mg/mL]
5 nm AuNPs	3.80×10^{-2}	0.81	2.44×10^{-4}	1.90×10^{-2}	9.89	6.59×10^{-3}
25 nm AuNPs	0.38	0.72	2.14×10^{-4}	0.38	64.30	4.28×10^{-2}
50 nm AuNPs	0.30	24.39	7.30×10^{-3}	0.30	536.18	0.36
100 nm AuNPs	0.06	62.90	1.88×10^{-2}	0.02	96.33	6.42×10^{-2}
40 nm AuNRs	0.05	0.33	1.00×10^{-4}	0.05	35.26	2.35×10^{-2}
100 nm AuNRs	0.12	6.00	1.80×10^{-3}	0.05	138.32	9.22×10^{-2}
4 nm IONPs	0.02	1.22	3.66×10^{-4}	0.012	4.75	3.17×10^{-3}
8 nm IONPs	0.03	4.54	1.36×10^{-4}	0.03	33.35	2.22×10^{-2}
Iohexol	30.02	10.21	3.06×10^{-3}	30.02	26.92	1.80×10^{-2}
Gadodiamide	0.98	0.44	1.32×10^{-4}	0.49	0.67	4.44×10^{-4}

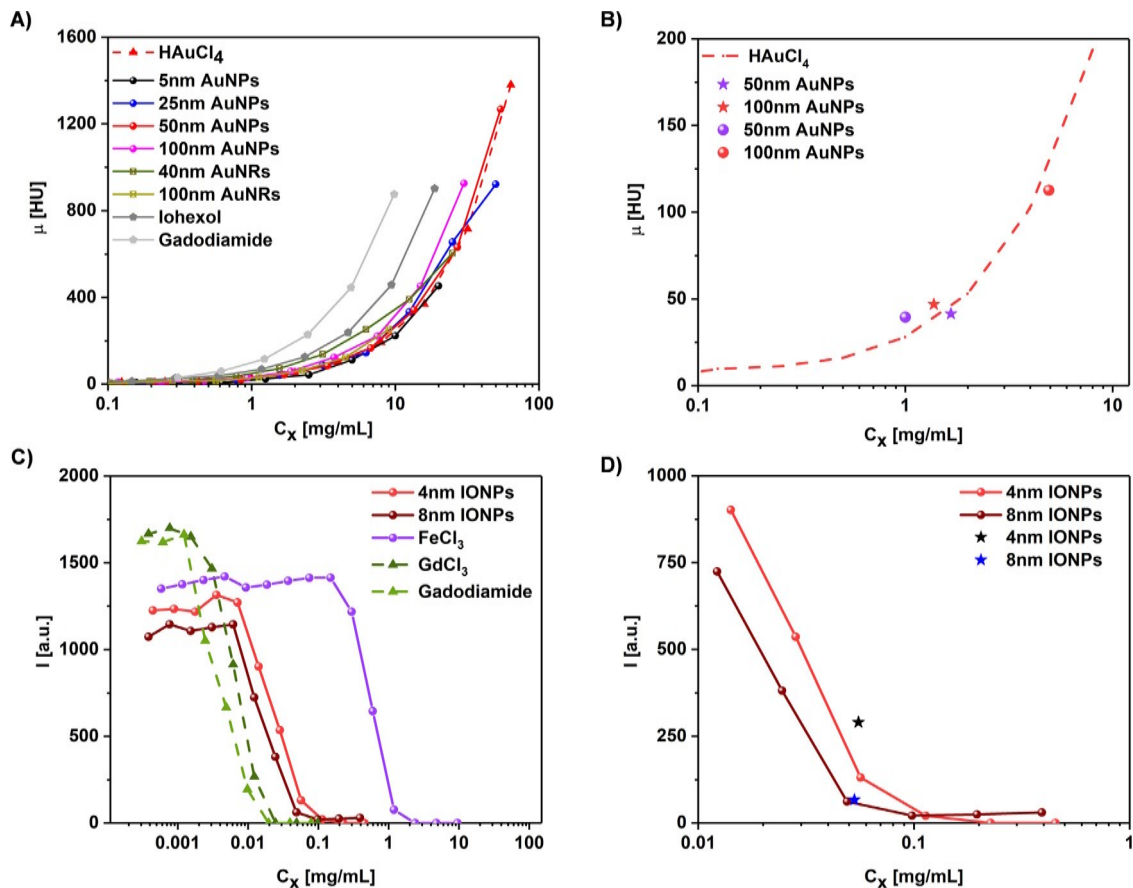


Fig. 9. (A) Normalized attenuation μ versus the concentration of AuNPs in 1% agarose phantoms at different Au ($C_x = C_{Au}$) concentrations. As reference control, HAuCl₄, Iohexol, and Gadodiamide at different Au ($C_x = C_{Au}$), I ($C_x = C_I$), and Gd ($C_x = C_{Gd}$) concentration C_x were used. (B) Zoom into the data shown in (A) were attenuation values μ of label human MSCs (sphere-symbols) and MHS macrophages (star-symbols) labeled with 50 nm and 100 nm AuNPs are also presented. The results indicate that the normalized attenuation directly depends of the concentration of elemental gold, i.e. the values for HAuCl₄ and for AuNPs are on the same calibration curve. (C) T_2 -contrast I of IONPs at different Fe ($C_x = C_{Fe}$) concentrations. As reference control, Gadodiamide, FeCl₃, and GdCl₃ at different Gd ($C_x = C_{Gd}$) and Fe ($C_x = C_{Fe}$) concentrations C_x were used. (D) MRI of labeled human MSCs with 4 nm and 8 nm IONPs are shown and compared with the calibration curve of pure IONPs. See the SI section X–XI for detailed information.

Table 3

Prediction contrast toward CT and MRI. Cells were labeled with AuNPs and IONPs at the maximum exposure concentration C_x^* . Using the values of Table 2 the maximum amount of Au and Fe inside cells then is known. Based on the calibration curves shown in Fig. 9 the normalized attenuation μ^* for CT and the T_2 MRI contrast I^* were calculated for 25,000,000 cells.

Samples	Cell type	μ^* [HU]	I^* [a.u.]
5 nm AuNPs	Human MSCs	9.1	–
25 nm AuNPs	Human MSCs	9.2	–
50 nm AuNPs	Human MSCs	64.5	–
100 nm AuNPs	human MSCs	53.7	–
40 nm AuNRs	Human MSCs	8.2	–
100 nm AuNRs	Human MSCs	18.4	–
4 nm IONPs	Human MSCs	–	429.0
8 nm IONPs	Human MSCs	–	32.8
5 nm AuNPs	Horse MSCs	8.3	–
25 nm AuNPs	Horse MSCs	8.3	–
50 nm AuNPs	Horse MSCs	13.4	–
100 nm AuNPs	Horse MSCs	21.8	–
40 nm AuNRs	Horse MSCs	8.2	–
100 nm AuNRs	Horse MSCs	9.4	–
4 nm IONPs	Horse MSCs	–	1079.2
8 nm IONPs	Horse MSCs	–	178.8
5 nm AuNPs	MHS cells	9.9	–
25 nm AuNPs	MHS cells	19.7	–
50 nm AuNPs	MHS cells	105.2	–
100 nm AuNPs	MHS cells	25.5	–
40 nm AuNRs	MHS cells	14.5	–
100 nm AuNRs	MHS cells	33.2	–
4 nm IONPs	MHS cells	–	319.8
8 nm IONPs	MHS cells	–	27.7

using NPs rather than CA. Our study indicates that for NP labeling for CT, the choice of the size of the AuNPs is crucial factor.

4. Materials and methods

For the full description of the materials and methods we refer to Supporting Information.

Nanoparticles synthesis and characterization: The synthesis of the different AuNPs and IONPs and their characterization was carried out as previously described [35,47]. Full protocols are reported in SI. A similar library was synthesized recently [34], but the data of these study are based on a new, individually synthesized library.

Cell culture: Human, dog, and horse stem cells were extracted and cultured as previously reported [7,19,50]. MSCs were maintained in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), streptomycin (100 μ g/mL)–penicillin (100 U/mL) (P/S), L-glutamine (2 mM). The MHS cells were maintained in RPMI medium supplemented with 10% FBS, 1 mM Na-pyruvate, P/S, and β -mercaptoethanol (0.05 mM). The cells were cultivated in flasks at 37 °C and 5% CO₂, until they reached confluence.

Determination of cellular parameters: For determining the cross section area the actin network of the cells was fluorescence-stained, and the area of the stained cell surface was recorded from fluorescence images. The time required to duplication of the number of cells due to cell division was determined from the normalized change of cell number per time interval by counting the number of cells on culture substrates at different times after seeding: $[(N_{\text{cell}}(\Delta t) - N_{\text{cell}}(0))/N_{\text{cell}}(0)]/\Delta t$. The average time for cell division $T_{1/2,\text{cell}}$ was then determined as the time in which the cell number doubles: $2 = [(N_{\text{cell}}(T_{1/2,\text{cell}}) - N_{\text{cell}}(0))/N_{\text{cell}}(0)]/T_{1/2,\text{cell}}$.

Cell viability assay: The cell viability V of MSCs and MHS macrophages exposed to different NPs and CAs at different concentrations and time points was evaluated using the resazurin assay as previously reported [45,51].

Cell proliferation assay: The cell proliferation P of MSCs and MHS macrophages exposed to different NPs and CAs at different concentrations and time points was evaluated by directly

measuring DNA synthesis, investigated by the incorporation of the thymidine-analog EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) by cells as previously reported [48].

Cellular uptake of NPs: The intracellular concentrations of Au, Fe, I, and Gd were evaluated following incubation of MSCs and macrophages with NPs and CAs at different concentration for 4, 24, and 48 h in serum supplemented medium. The intracellular concentration was evaluated using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) as previously reported [19].

Exocytosis studies: The amount of exocytosed NPs was evaluated over time after exposure of cells to NPs, followed by removal of NPs from the extracellular medium by rinsing, and then measuring the rise in extracellular NP concentration due to exocytosis [19].

Computer tomography (CT) and magnetic resonance imaging (MRI): In order to evaluate the contrast of different NPs for CT and MIR imaging phantom samples of NPs and CAs at different concentration were prepared and imaged with the respective instruments.

Acknowledgements

We acknowledge Prof. Dr. Frauke Alves and Dr. Christian Dullin for their guidance on MHS cells. We acknowledge Marta Gallego for her contribution to the TEM images. We acknowledge Prof. Dr. Stefan Arnhold for his contribution to the Horse MSCs cultures. This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, grant 794/25-1). XS was supported by the Chinese Scholarship Council (CSC). MG was supported by the Fazit Foundation. IC was an Alexander von Humboldt fellow. NF received funding from the Swedish Innovation Agency, Vinnova.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.apmt.2018.12.006.

References

- [1] S. Wilhelm, A.J. Tavares, Q. Dai, S. Ohta, J. Audet, H.F. Dvorak, W.C.W. Chan, Analysis of nanoparticle delivery to tumours, *Nat. Rev. Mater.* 1 (2016) 16014.
- [2] C. Xie, Z. Yang, Y. Suo, Q. Chen, D. Wei, X. Weng, Z. Gu, X. Wei, Systemically infused mesenchymal stem cells show different homing profiles in healthy and tumor mouse models, *Stem Cells Transl. Med.* 6 (4) (2017) 1120–1131.
- [3] S. Soontararak, L. Chow, V. Johnson, J. Coy, W. Wheat, D. Regan, S. Dow, Mesenchymal stem cells (MSC) derived from induced pluripotent stem cells (iPSC) equivalent to adipose-derived MSC in promoting intestinal healing and microbiome normalization in mouse inflammatory bowel disease model, *Stem Cells Transl. Med.* 7 (6) (2018) 456–467.
- [4] A. Mantovani, F. Marchesi, A. Malesci, L. Laghi, P. Allavena, Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 14 (7) (2017) 399–416.
- [5] P. Tiet, J.M. Berlin, Exploiting homing abilities of cell carriers: targeted delivery of nanoparticles for cancer therapy, *Biochem. Pharmacol.* 145 (2017) 18–26.
- [6] Y. Zhao, S. Tang, J. Guo, M. Alahdal, S. Cao, Z. Yang, F. Zhang, Y. Shen, M. Sun, R. Mo, L. Zong, L. Jin, Targeted delivery of doxorubicin by nano-loaded mesenchymal stem cells for lung melanoma metastases therapy, *Sci. Rep.* 7 (2017) 44758.
- [7] M.A. Kolecka, S. Arnhold, M. Schmidt, C. Reich, M. Kramer, K. Failing, K. von Pickler, Behaviour of adipose-derived canine mesenchymal stem cells after superparamagnetic iron oxide nanoparticles labelling for magnetic resonance imaging, *BMC Vet. Res.* (2017) 13.
- [8] H. Cho, S. Choi, N. Lee, T. Hyeon, H. Kim, W. Moon, Macrophages homing to metastatic lymph nodes can be monitored with ultrasensitive ferromagnetic iron-oxide nanocubes and a 1.5 T clinical MR scanner, *PLoS ONE* 7 (1) (2012) 90–99.
- [9] K. Kirschbaum, J.K. Sonner, M.W. Zeller, K. Deumelandt, J. Bode, R. Sharma, T. Krüwel, M. Fischer, A. Hoffmann, M. Costa da Silva, M.U. Muckenthaler, W. Wick, B. Tewes, J.W. Chen, S. Heiland, M. Bendszus, M. Platten, M.O. Breckwoldt, In vivo nanoparticle imaging of innate immune cells can serve as a marker of disease severity in a model of multiple sclerosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (46) (2016) 13227–13232.
- [10] E.T. Ahrens, J.W. Bulte, Tracking immune cells in vivo using magnetic resonance imaging, *Nat. Rev. Immunol.* 13 (10) (2013) 755–763.

- [11] S.S. Moonshi, C. Zhang, H. Peng, S. Puttick, S. Rose, N.M. Fisk, K. Bhakoo, B.W. Stringer, G.G. Qiao, P.A. Gurr, A.K. Whittaker, A unique (19)F MRI agent for the tracking of non phagocytic cells in vivo, *Nanoscale* 10 (17) (2018) 8226–8239.
- [12] L. Liu, L. Tseng, Q. Ye, Y.L. Wu, D.J. Bain, C. Ho, A new method for preparing mesenchymal stem cells and labeling with ferumoxytol for cell tracking by MRI, *Sci. Rep.* 6 (2016) 26271.
- [13] S. Ashraf, A. Taylor, J. Sharkey, M. Barrow, P. Murray, B. Wilm, H. Poptani, M.J. Rosseinsky, D.J. Adamsde, R. Lévy, In vivo fate of free and encapsulated iron oxide nanoparticles after injection of labelled stem cells, *Nanoscale Adv.* (2019), <http://dx.doi.org/10.1039/C8NA00098K> (in press) <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2019/na/c8na00098k#divAbstract>.
- [14] Y.L. Liu, K.L. Ai, L.H. Lu, Nanoparticulate X-ray computed tomography contrast agents: from design validation to in vivo applications, *Acc. Chem. Res.* 45 (10) (2012) 1817–1827.
- [15] J. Comenge, O. Fraguero, J. Sharkey, A. Taylor, M. Held, N.C. Burton, B.K. Park, B. Wilm, P. Murray, M. Brust, R. Levy, Preventing plasmon coupling between gold nanorods improves the sensitivity of photoacoustic detection of labeled stem cells in vivo, *ACS Nano* 10 (7) (2016) 7106–7116.
- [16] T. Kim, J.E. Lemaster, F. Chen, J. Li, J.V. Jokerst, Photoacoustic imaging of human mesenchymal stem cells labeled with prussian blue-poly(L-lysine) nanocomplexes, *ACS Nano* 11 (9) (2017) 9022–9032.
- [17] K.D. Wegner, N. Hildebrandt, Quantum dots: bright and versatile in vitro and in vivo fluorescence imaging biosensors, *Chem. Soc. Rev.* 44 (14) (2015) 4792–4834.
- [18] S.M. Kim, C.H. Jeong, J.S. Woo, C.H. Ryu, J.H. Lee, S.S. Jeun, In vivo near-infrared imaging for the tracking of systemically delivered mesenchymal stem cells: tropism for brain tumors and biodistribution, *Int. J. Nanomed.* 11 (2016) 13–23.
- [19] P. Nold, R. Hartmann, N. Feliu, K. Kantner, M. Gamal, B. Pelaz, J. Hühn, X. Sun, P. Jungebluth, P. Pino, d. Hackstein, H. Macchiarini, P. Parak, W.J. Brendel, Optimizing conditions for labeling of mesenchymal stromal cells (MSCs) with gold nanoparticles: a prerequisite for in vivo tracking of MSCs, *J. Bionanotechnol.* 15 (2017) 24.
- [20] J. Choi, H.Y. Kim, E.J. Ju, J. Jung, J. Park, H.K. Chung, J.S. Lee, J.S. Lee, H.J. Park, S.Y. Song, S.Y. Jeong, E.K. Choi, Use of macrophages to deliver therapeutic and imaging contrast agents to tumors, *Biomaterials* 33 (16) (2012) 4195–4203.
- [21] G. von Maltzahn, J.-H. Park, A. Agrawal, N.K. Bandaru, S.K. Das, M.J. Sailor, S.N. Bhatia, Computationally guided photothermal tumor therapy using long-circulating gold nanorod antennas, *Cancer Res.* 69 (9) (2009) 3892–3900.
- [22] Y. Liu, M. Yang, J. Zhang, X. Zhi, C. Li, C. Zhang, F. Pan, K. Wang, Y. Yang, J. Martinez de la Fuentea, D. Cui, Human induced pluripotent stem cells for tumor targeted delivery of gold nanorods and enhanced photothermal therapy, *ACS Nano* 10 (2) (2016) 2375–2385.
- [23] S.S. Lucky, K.C. Soo, Y. Zhang, Nanoparticles in photodynamic therapy, *Chem. Rev.* 115 (4) (2015) 1990–2042.
- [24] A.V. Naumova, M. Modo, A. Moore, C.E. Murry, J.A. Frank, Clinical imaging in regenerative medicine, *Nat. Biotechnol.* 32 (8) (2014) 804–818.
- [25] B. Zhang, W. Yan, Y. Zhu, W. Yang, W. Le, B. Chen, R. Zhu, L. Cheng, Nanomaterials in neural-stem-cell-mediated regenerative medicine: imaging and treatment of neurological diseases, *Adv. Mater.* 30 (17) (2018) e1705694.
- [26] Y. Jin, C. Jia, S.-W. Huang, M. O'Donnell, X. Gao, Multifunctional nanoparticles as coupled contrast agents, *Nat. Commun.* (2010) 1.
- [27] J. Santelli, S. Lechevallier, H. Baaziz, M. Vincent, C. Martinez, R. Mauricot, A. Parini, M. Verelst, D. Cussac, Multimodal gadolinium oxysulfide nanoparticles: a versatile contrast agent for mesenchymal stem cell labeling, *Nanoscale* 10 (35) (2018) 16775–16786.
- [28] B. Pelaz, C. Alexiou, R.A.A. Puebla, F. Alves, A.M. Andrews, S. Ashraf, L.P. Balogh, L. Ballerini, A. Bestetti, C. Brendel, S. Bosi, M. Carril, W.C.W. Chan, C. Chen, X. Chen, X. Chen, Z. Cheng, D. Cui, J. Du, C. Dullin, A. Escudero, N. Feliu, M. Gao, M. George, Y. Gogotsi, A. Grünweller, Z. Gu, N. Halas, N. Hampp, R.K. Hartmann, M.C. Hersam, P. Hunziker, J. Jian, X. Jiang, P. Jungebluth, P. Kadhiresan, K. Kataoka, A. Khademhosseini, J. Kopecek, N.A. Kotov, H.F. Krug, D.S. Lee, C.-M. Lehr, K.W. Leong, X.-J. Liang, M.L. Lim, L.M.L. Marzán, X. Ma, P. Macchiarini, H. Meng, H. Möhwald, P. Mulvaney, A.E. Nel, S. Nie, P. Nordlander, T. Okano, J. Oliveira, T.H. Park, R.M. Penner, M. Prato, V. Puentes, V.M. Rotello, A. Samarakoon, R.E. Schaak, Y. Shen, S. Sjöqvist, A.G. Skirtach, M.G. Soliman, M.M. Stevens, H.-W. Sung, B.Z. Tang, R. Tietze, B.N. Udagama, J.S. VanEpps, T. Weil, P.S. Weiss, I. Willner, Y. Wu, L. Yang, Z. Yue, Q. Zhang, Q. Zhang, X.E. Zhang, Y. Zhao, X. Zhou, W.J. Parak, Diverse applications of nanomedicine, *ACS Nano* 11 (2017) 2313–2381.
- [29] B.D. Chithrani, A.A. Ghazani, W.C.W. Chan, Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells, *Nano Lett.* 6 (4) (2006) 662–668.
- [30] N. Feliu, J. Hühn, M.V. Zyuzin, S. Ashraf, D. Valdeperez, A. Masood, A.H. Said, A. Escudero, B. Pelaz, E. Gonzalez, M.A.C. Duarte, S. Roy, I. Chakraborty, M.L. Lim, S. Sjöqvist, P. Jungebluth, W.J. Parak, Quantitative uptake of colloidal particles by cell cultures, *Sci. Total Environ.* 568 (2016) 819–828.
- [31] P. Sprawls, X-ray image formation and contrast, <http://www.sprawls.org/resources>.
- [32] H. Lusic, M.W. Grinstaff, X-ray-computed tomography contrast agents, *Chem. Rev.* 113 (3) (2013) 1641–1666.
- [33] N. Feliu, B. Pelaz, Q. Zhang, P. delPino, A. Nyström, W.J. Parak, Nanoparticle dosage—a nontrivial task of utmost importance for quantitative nanosafety research, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 8 (2016) 479–492.
- [34] M. Xu, M.G.M. Soliman, X. Sun, B. Pelaz, N. Feliu, W.J. Parak, S. Liu, Towards the prediction of protein corona formation and in vitro and in vivo interactions of gold nanoparticles based on their physicochemical properties, *ACS Nano* 12 (10) (2018) 10104–10113, <http://dx.doi.org/10.1021/acsnano.8b04906> (in press) Epub 2018 Sep 21.
- [35] J. Hühn, C. Carrillo-Carrion, M.G. Soliman, C. Pfeiffer, D. Valdeperez, A. Masood, I. Chakraborty, L. Zhu, M. Gallego, Y. Zhao, M. Carril, N. Feliu, A. Escudero, A.M. Alkilany, B. Pelaz, P. Pino, W.J. Parak, Selected standard protocols for the synthesis phase transfer, and characterization of inorganic colloidal nanoparticles, *Chem. Mater.* 29 (2017) 399–461.
- [36] N. Feliu, X. Sun, R.A.A. Puebla, W.J. Parak, Quantitative particle–cell interaction: some basic physicochemical pitfalls, *Langmuir* 33 (2017) 6639–6646.
- [37] G.M. DeLoid, J.M. Cohen, G. Pyrgiotakis, P. Demokritou, Preparation, characterization, and in vitro dosimetry of dispersed, engineered nanomaterials, *Nat. Protoc.* 12 (2) (2017) 355–371.
- [38] H.H. Gustafson, D. Holt-Casper, D.W. Grainger, H. Ghandehari, Nanoparticle uptake: the phagocyte problem, *Nano Today* 10 (4) (2015) 487–510.
- [39] W.J. Parak, R. Boudreau, M.L. Gros, D. Gerion, D. Zanchet, C.M. Micheel, S.C. Williams, A.P. Alivisatos, C.A. Larabell, Cell motility and metastatic potential studies based on quantum dot imaging of phagokinetic tracks, *Adv. Mater.* 14 (12) (2002) 882–885.
- [40] E. Panet, T. Mashriki, R. Lahmi, A. Jacob, E. Ozer, M. Vecsler, I. Lazar, A. Tzur, The interface of nanoparticles with proliferating mammalian cells, *Nat. Nanotechnol.* 12 (2017) 598–600.
- [41] M.J. Pittet, F.K. Swirski, R. Reynolds, L. Josephson, R. Weissleder, Labeling of immune cells for in vivo imaging using magnetofluorescent nanoparticles, *Nat. Protoc.* 1 (1) (2006) 73–79.
- [42] D. Bartczak, S. Nitti, T.M. Millar, A.G. Kanaras, Exocytosis of peptide functionalized gold nanoparticles in endothelial cells, *Nanoscale* (2012).
- [43] N. Oh, J.H. Park, Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells, *Int. J. Nanomed.* 9 (Suppl. 1) (2014) 51–63.
- [44] N. Oh, J.H. Park, Surface chemistry of gold nanoparticles mediates their exocytosis in macrophages, *ACS Nano* 8 (6) (2014) 6232–6241.
- [45] N. Feliu, P. Kohonen, J. Ji, Y.N. Zhang, H.L. Karlsson, L. Palmberg, A. Nystrom, B. Fadeel, Next-generation sequencing reveals low-dose effects of cationic dendrimers in primary human bronchial epithelial cells, *ACS Nano* 9 (1) (2015) 146–163.
- [46] T.B. Huff, M.N. Hansen, Y. Zhao, J.X. Cheng, A. Wei, Controlling the cellular uptake of gold nanorods, *Langmuir* 23 (4) (2007) 1596–1599.
- [47] M.G. Soliman, B.P. Parak, W.J. Pino, Phase transfer and polymer coating methods toward improving the stability of metallic nanoparticles for biological applications, *Chem. Mater.* 27 (2015) 990–997.
- [48] X. Ma, R. Hartmann, D.J. Aberasturi, d. Yang, F. Soenen, S.J.H. Manshian, B.B. Franz, J. Valdeperez, D. Pelaz, B. Feliu, N. Hampp, N. Riethmüller, C. Vieker, H. Frese, N. Götzhäuser, A. Simonich, M. Tanguay, R.L. Liang, X.-J. Parak, Colloidal gold nanoparticles induce changes in cellular and subcellular morphology, *ACS Nano* 11 (2017) 7807–7820.
- [49] M. Mionic Ebersold, D. Bonvin, H. Hofmann, Neglected nano-effects of nanoparticles in the interpretation of their toxicity, *Analyst* 143 (4) (2018) 837–842.
- [50] P. Nold, C. Brendel, A. Neubauer, G. Bein, H. Hackstein, Good manufacturing practice-compliant animal-free expansion of human bone marrow derived mesenchymal stroma cells in a closed hollow-fiber-based bioreactor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430 (1) (2013) 325–330.
- [51] S. Ashraf, J. Park, M. Bichelberger, K. Kantner, R. Hartmann, P. Maffre, A.H. Said, N. Feliu, J. Lee, D. Lee, G.U. Nienhaus, S. Kim, W.J. Parak, Zwitterionic surface coating of quantum dots reduces protein adsorption and cellular uptake, *Nanoscale* 10 (2016) 1318–1328.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Behaviour of adipose-derived canine mesenchymal stem cells after superparamagnetic iron oxide nanoparticles labelling for magnetic resonance imaging

Malgorzata Anna Kolecka^{1*}, Stefan Arnhold², Martin Schmidt¹, Christine Reich², Martin Kramer¹, Klaus Failing³ and Kerstin von Pückler¹

Abstract

Background: Therapy with mesenchymal stem cells (MSCs) has been reported to provide beneficial effects in the treatment of neurological and orthopaedic disorders in dogs. The exact mechanism of action is poorly understood. Magnetic resonance imaging (MRI) gives the opportunity to observe MSCs after clinical administration. To visualise MSCs with the help of MRI, labelling with an MRI contrast agent is necessary. However, it must be clarified whether there is any negative influence on cell function and viability after labelling prior to clinical administration.

Results: For the purpose of the study, seven samples with canine adipose-derived stem cells were incubated with superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIO: 319.2 µg/mL Fe) for 24 h. The internalisation of the iron particles occurred via endocytosis. SPIO particles were localized as free clusters in the cytoplasm or within lysosomes depending on the time of investigation. The efficiency of the labelling was investigated using Prussian blue staining and MACS assay. After 3 weeks the percentage of SPIO labelled canine stem cells decreased. Phalloidin staining showed no negative effect on the cytoskeleton. Labelled cells underwent osteogenic and adipogenic differentiation. Chondrogenic differentiation occurred to a lesser extent compared with a control sample. MTT-Test and wound healing assay showed no influence of labelling on the proliferation. The duration of SPIO labelling was assessed using a 1 Tesla clinical MRI scanner and T2 weighted turbo spin echo and T2 weighted gradient echo MRI sequences 1, 2 and 3 weeks after labelling. The hypointensity caused by SPIO lasted for 3 weeks in both sequences.

Conclusions: An Endorem labelling concentration of 319.2 µg/mL Fe (448 µg/mL SPIO) had no adverse effects on the viability of canine ASCs. Therefore, this contrast agent could be used as a model for iron oxide labelling agents. However, the tracking ability in vivo has to be evaluated in further studies.

Keywords: Canine adipose-derived mesenchymal stem cells, Superparamagnetic iron oxide particles, Endorem, Magnetic resonance

* Correspondence: Malgorzata.Kolecka@vetmed.uni-giessen.de;
gkolecka@gmail.com

¹Department of Veterinary Clinical Sciences, Clinic for Small Animal–Surgery,
Faculty of Veterinary Medicine, Justus–Liebig–University Giessen, Giessen,
Germany

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

The use of stem cells is becoming increasingly important in veterinary medicine. Mesenchymal stem cells (MSCs) have been shown to improve tissue repair in oral ulcers [1, 2] and bone defects [3–6], as well as in dogs with osteoarthritis of the coxofemoral and elbow joint [7–10]. MSCs have also been used in canine central nervous system to treat spinal cord injury [11–14] and ischemic brain infarction [15].

There is still little information about the exact mechanism of action of MSCs. The behaviour of the MSCs during the stem cell therapy can be examined non-invasively by magnetic resonance imaging (MRI). However, labelling of the stem cells is required in order to distinguish administered cells from the host tissue. A couple of intracellular strategies have been suggested to label MSCs [16–19]. One of them is based on the use of superparamagnetic iron oxide particles (SPIO). The advantage of SPIO particles is that they are taken up via endocytosis as well as by nonphagocytic cells and there is no need for a transfection agent [18, 20, 21]. A commercially available MRI contrast agent that contains a dextran coated SPIO formulation—ferrumoxides—is known under the name Endorem (Guerbet). Endorem affects the T2 relaxation time by inducing a strong field inhomogeneity, leading to a signal decrease as a result of the susceptibility changes in the tissues containing Endorem.

However, it is still unclear whether Endorem labelling has a negative influence on canine MSCs' viability, proliferation, cytoskeleton and differentiation potential. Another question concerns the duration of the labelling and the amount of contrast agent necessary to preserve detectability of the MSCs via MRI.

This study was designed to prospectively investigate the growth behaviour and MRI signal properties of adipose-derived canine stem cells (ASCs) after labelling with the MRI contrast agent Endorem using 1 Tesla MRI *in vitro*. The use of 1 Tesla MRI to detect Endorem labelled cells could enable routine examination after stem cell therapy in veterinary clinical practice to verify correct implantation and further distribution of the MSCs.

Methods

Isolation of canine mesenchymal stem cells

MSCs were isolated as previously reported [22] from intraabdominal or subcutaneous adipose tissue that was harvested from seven dogs during routine surgical procedures. Fat was removed in order to improve the intraoperative visibility of other organs and was supposed to be disposed. All dogs were free of systemic diseases.

Labelling of adipose derived mesenchymal stem cells

To assess the optimal labelling concentration of Endorem, three different concentration were tested (10 μ L (SPIO = 158 μ g/mL; Fe = 112 μ g/mL), 28.35 μ L (SPIO = 448 μ g/mL; Fe = 319.2 μ g/mL) and 40 μ L (SPIO = 632.4 μ g/mL; Fe = 448 μ g/mL). These concentrations were chosen according to the results of the doctoral thesis of Kruttwig (2009). An Endorem concentration of 28.35 μ L in 1 mL of medium labelled most of the ASCs without comprising their spindle morphology. After labelling with the respective concentrations the live cell imaging observations remained unchanged. For this reason an Endorem concentration of 28.35 μ L was used in the present study. ASCs (150 000 cells) were incubated with Endorem at a concentration of 28.35 μ L/mL (SPIO = 448 μ g/mL; Fe = 319.2 μ g/mL) for 24 h.

Prussian blue staining (PB)

PB staining was performed on all seven samples 3 days, 1, 2 and 3 weeks after Endorem labelling to evaluate if SPIO were incorporated into the cells. Number of blue iron inclusions within the cells at all time intervals was assessed to set a reference value. After incubation the cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PF). The PB solution was prepared by mixing 3 mL of 2% potassium ferrocyanide (II) (Merck) with the same amount of 1% hydrochloric acid (Merck). The stain was then put on the cells at room temperature for 20 min. Nuclear fast red-aluminum sulphate staining was performed to colour the nuclei. All of the stained samples were then evaluated under a microscope (Axiophot, Zeiss) at 12.5x magnification.

Magnetic activated cell sorting (MACS)

MACS cell separation was undertaken to assess the efficiency of the labelling. A MiniMACS separator (Miltenyi Biotec) was used to sort the labelled from unlabelled cell population 1, 2 and 3 weeks after labelling using MS Column guidance (Miltenyi Biotec). After centrifugation both fractions of cells were counted using a Neubauer cell chamber (Marienfeld) to evaluate the percentage of each fraction.

Phalloidine staining (PS)

PS was performed with all samples 1 week after labelling. The distribution and integrity of the actin filaments of labelled cells was compared to that of unlabelled cells. Seven days after Endorem labelling, the labelled and unlabelled cells were fixed with 4% PF and permeabilized with 1% Triton (Serva). The cytoskeleton was stained with phalloidine (Sigma-Aldrich) and the nuclei contra-stained with Hoechst-33342 (Invitrogen). Fluorescence micrographs were taken with

an Axio Observer 2.1 (Zeiss) and a Leica Camera under 100- and 400× magnification.

Transmission electron microscopy (TEM)

TEM was performed on four samples to assess the intracellular location of Endorem particles. Unlabelled and labelled ASCs 1 and 3 (two samples) or 2 and 3 weeks (two samples) after Endorem labelling were investigated. After incubation in a Chamber Slide System (Thermo Fischer) unlabelled and labelled ASCs were fixed with Yellow-Fix (2% glutaraldehyde (Agar Scientific), 2% PF, and 0.02% picric acid (Fluka Analytical)), then postfixed with 1% osmium solution (Carl Roth). The samples were dehydrated with ethanol (Merck) and embedded in Epon (Serva). Ultrathin sections (70–90 nm) were stained with lead citrate and uranyl acetate (Leica microsystems), collected on copper grids and examined under a TEM 109 (Zeiss). Pictures were taken using a digital camera (Leica Camera DFC320, Leica microsystems).

Investigation of the influence of Endorem labelling on the multipotency of adipose derived stem cells

Adipogenic differentiation

For the evaluation of adipogenic differentiation, samples from two dogs were investigated. ASCs were divided into three groups: labelled, unlabelled and negative control cells. Both labelled and unlabelled cells were incubated in adipogenic medium (DMEM low glucose, Gibco life technologies), 10% FBS (PAA), 1% penicillin/streptomycin (AppliChem), 0.1 μM dexamethasone (Sigma Aldrich), 5 μg/mL ITS (Sigma Aldrich), 0.2 mM indomethacin (Sigma Aldrich) and 0.5 mM IBMX (Sigma Aldrich) for 2 weeks, while negative control cells were incubated in the standard medium. After this time the cell population was fixed in 4% PF and red oil O staining was performed. The nuclei were stained with hematoxyline (Merck) for 10 s. The glass slides with the stained cells were embedded in Kaiser's glycerol gelatine (Merck) and examined by light microscopy (Leica camera 090135006; Leica Microsystems).

Osteogenic differentiation

For the assessment of osteogenic differentiation, two samples were investigated. ASCs were divided as with the adipogenic differentiation into three groups. The labelled and unlabelled cell fractions were incubated in an osteogenic medium (DMEM low glucose, 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin, 0.1 μM dexamethasone, 10 mM β-glycerol phosphate (Sigma Aldrich), 0.06 mM ascorbic acid (Sigma Aldrich)) for 3 weeks, while the cells of the negative control were incubated in the standard medium. After fixation with 4% PF, von Kossa staining was performed. Cells were incubated in a 5% silver nitrate solution (Merck) for 30 min and then with 5%

sodium carbonate formaldehyde solution (Merck) for 5 min. After an incubation with Farmer's reducer for 30 s, the nuclei were stained with nuclear fast red-aluminium sulphate. Embedding was then performed corresponding to adipogenic differentiation.

Chondrogenic differentiation

For the evaluation of chondrogenic differentiation potential, two samples were investigated. ASCs were divided into three groups: labelled, unlabelled and negative control cells. Both the labelled and unlabelled cells were incubated in chondrogenic medium ((DMEM low glucose, 1% penicillin/streptomycin, 0.1 μM dexamethasone, 10 μg/mL ITS (Sigma Aldrich), 0.9 mM sodium pyruvate (Sigma Aldrich), 0.17 mM ascorbic acid, 0.35 mM proline (Sigma Aldrich), TGF – β (Sigma Aldrich)) for 4 weeks in 15 mL falcon tubes, while negative control cells were incubated in standard medium. After 4 weeks the entire cell population was fixed in 4% PF, embedded in paraffin and cut and stained with Alcian blue (Merck).

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) test

MTT test was performed on two samples to assess the influence of the Endorem labelling on the proliferation of the labelled cells. Stem cells were seeded at a density of 28 500 cells/ well in two 24 well plates. Half of the cells were labelled with Endorem, then incubated for 24 h, second plate 48 h, respectively. After this time 0.5 mg/mL MTT solution (Sigma Aldrich) was added to one of the plate for 4 h, then 200 μL DMSO (AppliChem) for 10 min. The absorption of the labelled and unlabelled cells was measured with Tecan sunrise (Tecan) 24 and 48 h after labelling.

Wound healing and migration

Migration and Proliferation of the labelled and unlabelled cells of 5 samples were further investigated using 2 well Culture inserts system (IBIDI) according to the guidelines. After 24 h incubation the culture insert was removed. Life cell imaging (Zeiss) was used to evaluate the "wound healing process" over 24 h. The evaluation of the cell uncovered area was assessed using Image J Software (National Institute of Health, USA) every 3 h over 24 h period.

Investigation of labelling efficiency via MRI

For the investigation of the labelling efficiency a 1 Tesla clinical MRI scanner (Gyrosan Intera, Philips Medical Systems) was used. Endorem labelled cells from all seven samples were placed into 0.5 ml 0.6% agar solution and then in an agar phantom 1, 2 and 3 weeks after labelling. The mean cell count was 1 800 857, 2 125 000, 2 538 928 for each week respectively. Additionally, a negative

control containing agar gel solely, a positive control with Endorem (concentration 28.35 $\mu\text{L}/\text{mL}$) and a control with the positive contrast agent Dotarem (Guerbert) were investigated. A horizontally oriented gradient echo (T2w FFE) (field of view 140 mm, repetition time 200 ms, time of echo 21 ms, 17 slices, thickness 1.5 mm /-0.9 mm, flip angle 30°) and a turbo spin echo sequence (T2w TSE) (field of view 200 mm, repetition time 6000 ms, time of echo 71 ms, 14 slices, thickness 1.6 mm /-1 mm) were performed. The voxel size and number of voxels per sample can be found in the Table 1. For the relative estimation of the signal intensity a dedicated software (View Forum R6.3V1L7 SP1 2010, Philips Medical System) was used. The signal intensity was measured for every sample (agar with labelled cells, negative control, agar with Endorem). For this purpose a region of interest (ROI) of 24 mm² was placed in every sample. A graph illustrates the signal intensity and its frequency within every sample and also maximal, minimal and mean values including the standard deviation (Fig. 1).

Statistical analysis

One-way analysis of variance with repeated measurements was performed to assess the decrease in the labelled cells in the MACS test over 3 weeks. To determine reference values of the labelled cells 1, 2 and 3 weeks after labelling in the MACS test and the value of the number of Endorem particles in a single cell in the Prussian blue staining, a 95% confidence interval was calculated.

Influence of Endorem labelling in the migration and wound healing assay was performed using *t*-test. Further, the influence of the cell line on the wound healing process was assessed using Pearson correlation test.

The development of the signal intensity of the labelled cells in MRI was assessed with 2-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measurements with respect to the MRI sequence and the point in time.

Furthermore, correlation analysis with the Pearson's correlation coefficient was performed between the signal intensities of both MRI sequences and the MACS test for 1, 2 and 3 weeks after labelling.

Results

Isolation of ASCs and efficiency of Endorem labelling in the Prussian blue staining and MACS assay

ASCs could be easily isolated from canine adipose tissue. After 24 h incubation plastic adherent cells with fibroblastic morphology could be observed. Three days after

labelling with PB there were numerous blue iron inclusions visible within the cells (Fig. 2a). An Endorem concentration of 448 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SPIO was sufficient to visually label all cells within 24 h. Iron particles were still detectable in the cells 3 weeks after labelling with Endorem (Fig. 2d). The iron particles were not equally subdivided to the daughter cells during cell division. It was not possible to set a reference value of iron particles within a single cell at time intervals of three, seven, fourteen and twenty one days with a 95% confidence interval calculation.

In the MACS assay, one week after labelling the labelled cells accounted for: 92.36%, 91.28%, 92.78%, 87.5%, 84.04%, 46.3% and 25.4% of all cells in samples one – seven, respectively; 2 weeks after labelling: 70.71%, 70.2%, 71.64%, 62.27%, 61.97%, 32.4%, 18.3%; and 3 weeks after labelling: 68.79%, 78.53%, 59%, 73.4%, 20.33%, 27.7%, 11.1%. It was not possible to determine reference values of the percentage of labelled cells for the time intervals of 1, 2 and 3 weeks.

Influence of the Endorem labelling on the cytoskeleton

A comparison of the integrity and distribution of actin filaments in the labelled and unlabelled cells under 100 and 400 times magnification revealed no alterations (Fig. 3a, b).

Transmission electron microscopy (TEM) examination: distribution of the Endorem particles within the cell

Under TEM, SPIO particles were seen within the cells and also within vesicles outside the cells (Fig. 4 a-d). The moment of endocytosis of SPIO into the cell and formation of a membrane vesicle could also be captured (Fig. 4 a). One and two weeks after labelling the iron clusters were mainly visible within the cytoplasm without compartmentalisation (Fig. 4 b, c). In week 3 the Endorem particles were basically detected in lysosomes (Fig. 4d).

Influence of the Endorem labelling on multipotency, proliferation and viability

Multipotency was assessed on the basis of adipogenesis, chondrogenesis and osteogenesis. Labelled and unlabelled cells incubated with adipogenic medium underwent adipogenic differentiation. Red Oil O stained cells showed multiple red fat vacuoles inside the cells (Fig. 5a, b). Labelled cells also underwent normal osteogenic differentiation. Under von Kossa

Table 1 Acquired, reconstructed voxel size (mm) and number of voxels per sample (24 mm²)

Sequence	Acquired Voxels (mm)	Reconstructed Voxels (mm)	Voxels per sample (24 mm ²)
T2FFE	0.55 x 0.55 x 1.5	0.55 x 0.55 x 1.5	43.64
T2wTSE	0.69 x 0.82 x 1.6	0.69 x 0.69 x 1.6	34.78

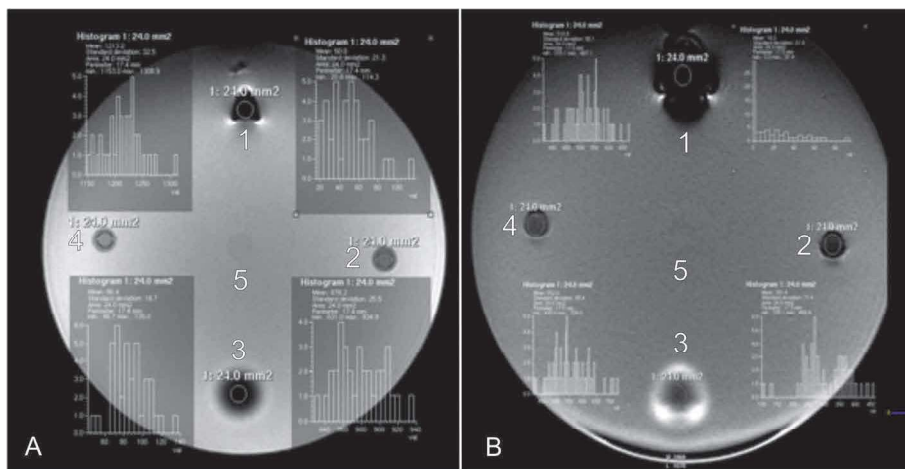


Fig. 1 Agar phantom scanned in the T2 TSE (a) and T2 FFE (b) with histograms showing measurement of the signal intensity of regions of interest (ROI) containing: (1) SPIO (pure Endorem); (2, 4) SPIO labelled ASCs; (3) Gadolinium MRI contrast agent (Dotarem); (5) negative control containing agarose gel only

staining, black stained precipitates in the extracellular matrix could be observed (Fig. 6a, b). The cell bodies also showed a black staining pattern. The control group exhibited no signs of mineralisation (Fig. 6c). In contrast to this, less labelled cells underwent chondrogenic differentiation comparing to the control (Fig. 7b). Interestingly, the negative control also showed signs of chondrogenesis (Fig. 7c).

In MTT test both samples 48 h after labelling showed a higher absorbance (unlabelled cells: sample one: 0.613; 0.480; 0.539; sample two: 0.501; 0.520; 0.486; labelled

cells: sample one: 0.786; 0.723; 0.712; sample two: 0.506; 0.396; 0.416) compared to samples 24 h after labelling (unlabelled cells: sample one: 0.079; 0.076; 0.071; sample two: 0.087; 0.080; 0.091; labelled cells: sample one: 0.096; 0.096; 0.071; sample two: 0.068; 0.052; 0.065).

Using the wound and healing assay it could be shown that there was no negative influence on cell migration and proliferation after SPIO labelling ($P = 0.023$). Furthermore, it could be demonstrated that there was a donor specific influence on cell migration and proliferation rather than an influence exerted by cell labelling.

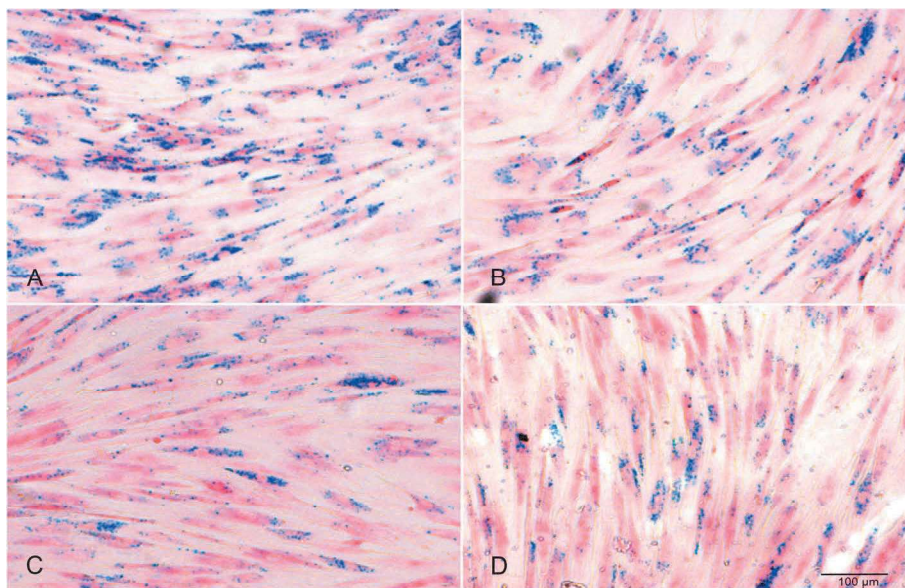


Fig. 2 Prussian Blue staining of SPIO-labelled canine ASCs shows blue iron particles within the cells after SPIO labelling. a Three days. b One week. c Two weeks. d Three weeks

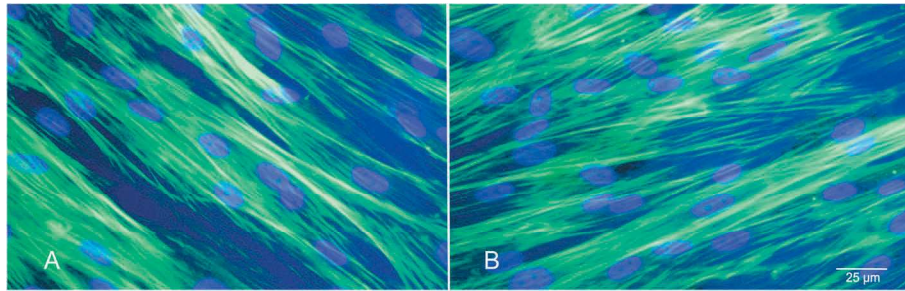


Fig. 3 Phalloidin staining shows no alteration of the green actin filaments of the cytoskeleton after labelling (b) comparing with unlabelled ASCs (a)

Investigation of labelling efficiency via magnetic resonance imaging

The hypointensity caused by Endorem lasted for 3 weeks in both sequences. The signal intensity for both sequences changed within the 3 week time period. These changes were significant ($P = 0.003$). A statistical correlation between the MACS test for 1, 2 and 3 weeks and the signal intensity in the T2 TSE for 1, 2 and 3 weeks was assessed (week 1: $P =$

0.945 ; $r = -0.032$; week 2: $P = 0.242$; $r = -0.510$; week 3: $P = 0.288$; $r = -0.469$) and for signal intensity in the T2 FFE (week 1: $P = 0.722$; $r = -0.166$; week 2: $P = 0.619$; $r = -0.231$; week 3: $P = 0.077$; $r = -0.705$).

The values of signal intensity in the T2w TSE and T2w FEE for 1, 2 and 3 weeks were correlated at each point in time (week 1: $P = 0.037$, $r = 0.784$; week 2: $P = 0.006$, $r = 0.9$; week 3: $P = 0.006$, $r = 0.896$) and for whole time period ($P < 0.001$; $r = 0.879$).

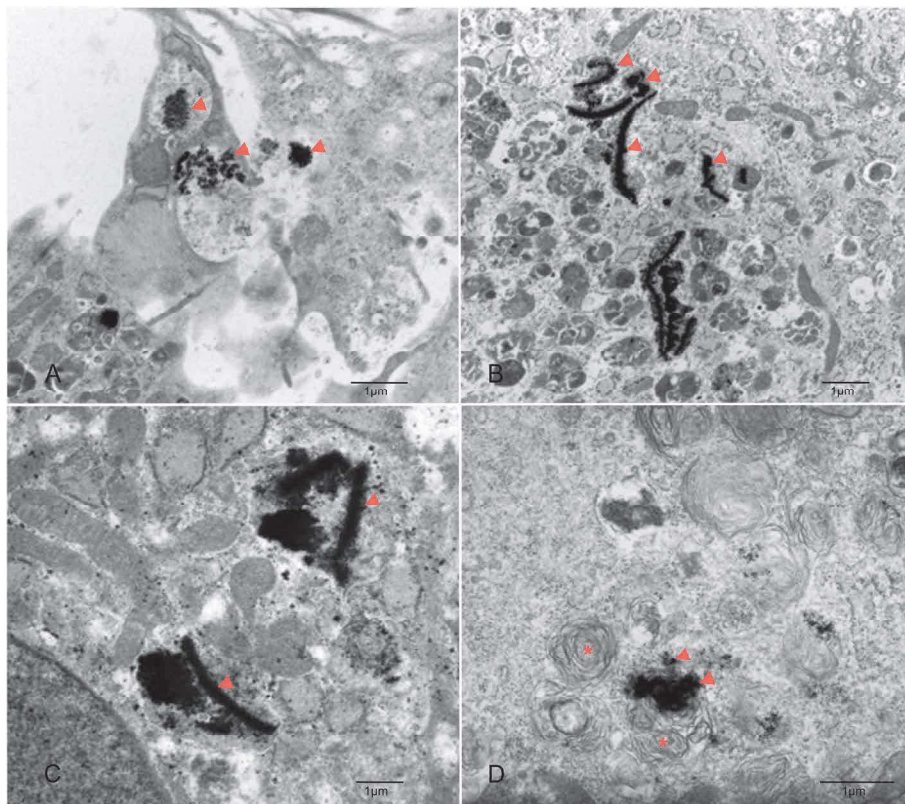


Fig. 4 Transmission electron microscopy (TEM) of SPIO labelled ASCs showing black iron inclusions (red arrows ►) in the cytoplasm. a Capture of the moment of endocytosis of SPIO into a cell and formation of a membrane vesicle. b Cluster of SPIO particles within the cytoplasm one week after labelling. c Cluster of SPIO particles within the cytoplasm two weeks after SPIO labelling. (d) SPIO cluster within lysosomes (asterisk ★) three weeks after labelling

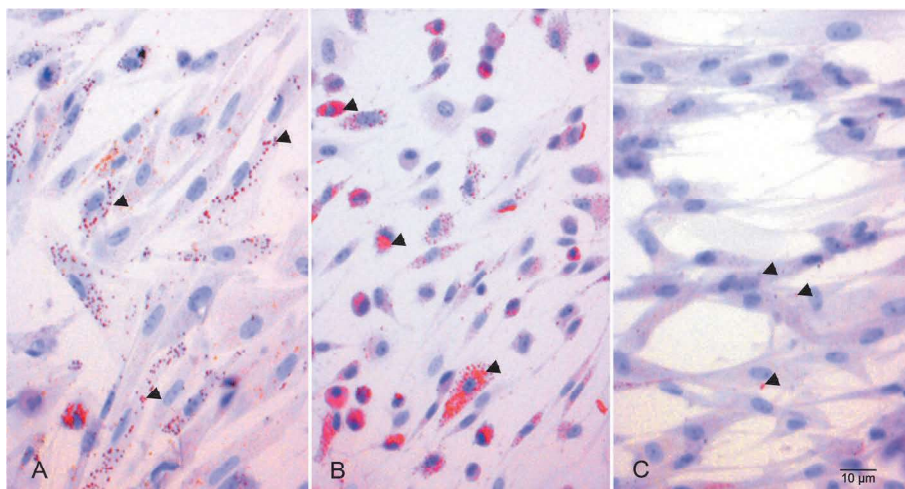


Fig. 5 Red Oil O staining shows red lipid vacuoles (arrows ►) in **(a)** Unlabelled ASCs cultured in adipogenic medium. **b** SPIO-labelled ASCs cultured in adipogenic medium. **c** Control with unlabelled ASCs incubated in standard medium

It was still possible to detect all of the samples of Endorem labelled stem cells with 1 Tesla MRI in the T2 TSE und T2 FFE sequences 3 weeks after labelling.

Discussion

The purpose of this study was the development of a labelling strategy for tracking canine ASCs using a clinical 1 Tesla magnetic resonance tomograph. We evaluated the survival, differentiation potential and tracking ability of MSCs after labelling with the contrast agent Endorem.

A number of labelling strategies with different contrast agents have already been used for tracking studies;

however, these used MR scanners with a higher magnetic field strength, between 3 and 7 Tesla [19, 23–25]. In most veterinary facilities only low-field MRI is available. We decided to analyse stem cells over a 21 day period of time, assuming that this time frame would be relevant for the distribution of MSCs after clinical application.

Because stem cell therapy has increasingly gained importance for use in veterinary medicine it is essential to develop an easy strategy for cell labelling that has no potential negative influence on cell function. ASCs were used in this study because of their uncomplicated isolation and high number of MSCs in fat tissue. Incubation

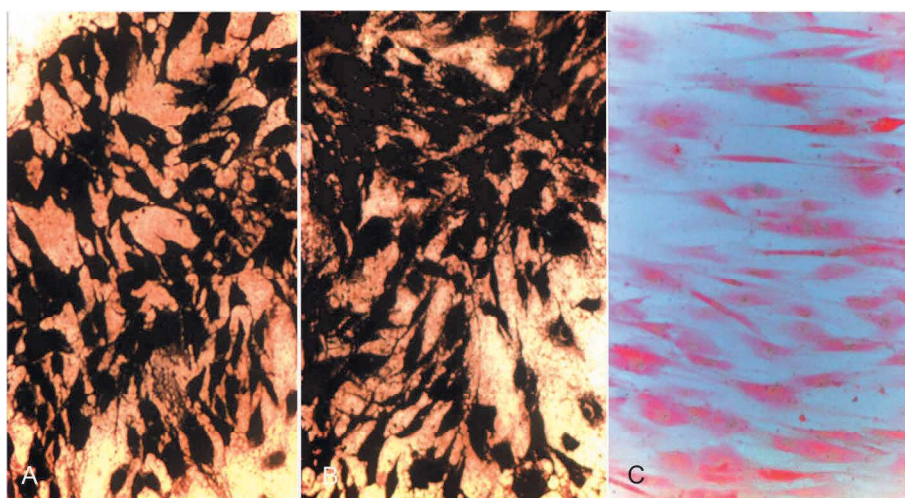


Fig. 6 Von Kossa staining shows black stained mineralised extracellular matrix. Note also the black staining of the cell bodies. **a** Unlabelled ASCs incubated in osteogenic medium. **b** SPIO-labelled ASCs incubated in osteogenic medium. **c** Control with unlabelled ASCs incubated in standard medium

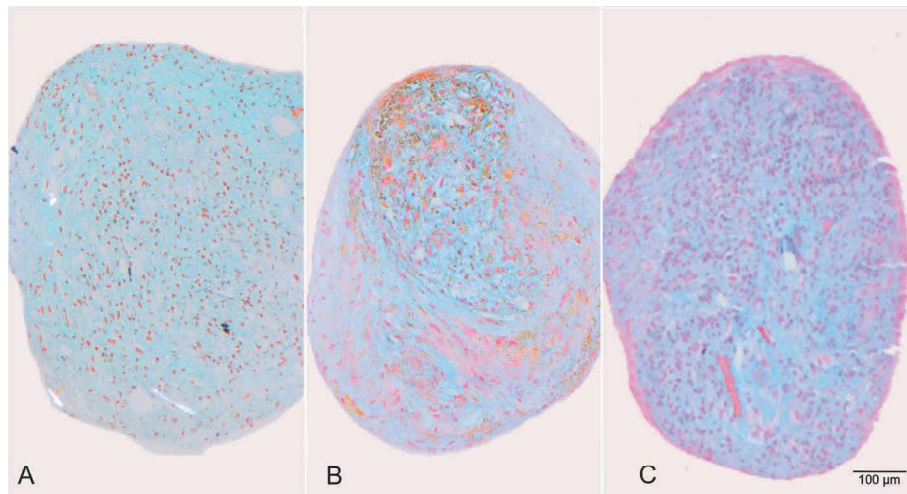


Fig. 7 Alcian blue staining shows blue stained proteoglycans of the cartilage matrix. **a** Unlabelled ASCs cultured in chondrogenic medium underwent completed chondrogenesis. **b** SPIO-labelled ASCs cultured in chondrogenic medium show chondrogenesis to a lesser extent than unlabelled cells. **c** Control with unlabelled ASCs incubated in standard medium also show signs of chondrogenesis

of canine MSCs with an Endorem concentration of 319.2 µg/mL iron for 24 h resulted in sufficient uptake and labelling of all cells. No transfection agent was used in this study. There have been several studies using different labelling protocols of SPIO with other concentrations and incubation times from 1 till 72 h. Longer incubation times and higher iron concentrations resulted in a negative influence on the labelled cells [26].

The spontaneous uptake of SPIOs from medium containing Endorem was confirmed with PB staining (Fig. 2a-d). Prussian blue staining is a reliable qualitative method to show Endorem particles within the cells. However, iron particles were not equally subdivided to the daughter cells during cell division what caused a substantial variation of the amount of iron particles within a single cell. Therefore, assessment of the reference values using a 95% confidence interval was not possible. Separation of the labelled cells from the unlabelled cells turned out to be a reliable quantitative method. With the aid of the MACS assay it could be shown that the percentage of labelled canine stem cells decreased within three weeks ($P = 0.0007$). Due to variation of the percentage of labelled cells it was not possible to set reference values for MACS test. The last two samples showed considerably lower labelling efficiency. These samples were investigated at the same time. There might be other influential factors as the composition of the medium or incubation protocol. However, this can be considered unlikely as we maintained the same condition during all parts of the study according to the standardized protocol. Another factor might be the variability of the stem cells behavior. As we showed in the migration and wound healing assay the

properties of an individual cell line has a more significant influence on the proliferation and migration than labelling. It can be possible that these stem cells did not incorporate SPIO particles to the same extent as other samples or the cells incorporated the SPIO particles but later released them into the medium.

Internalisation of the Endorem particles could also be confirmed using TEM. One and two weeks after labelling the iron clusters were mostly observed distributed within the cytoplasm (Fig. 4b, c). In contrast to that, three weeks after labelling Endorem particles were generally detected in the lysosomes and fewer non-compartment bound iron clusters were seen in the cytoplasm (Fig. 4d). This observation indicates that lysosomes are involved in the dissipation of Endorem and this process starts already two weeks after labelling. Previous studies reported that cluster of iron particles are surrounded by cell membrane structures directly after labelling but further fate of the iron cluster was not investigated [18, 23, 27]. There were no reports about free iron clusters within the cytoplasm. Investigation of the exact localisation of iron particles within the cells is very important due to the fact that their distribution is suspected to have a significant influence on the contrast induced signal void during the MRI examination. Larger iron clusters are responsible for a stronger signal void than the same amount of iron distributed evenly within the cell [17].

Phalloidin staining showed no negative influence of the iron particles on the cytoskeleton (Fig. 3b). This is of great importance considering the essential role of the cytoskeleton in migration capability and cell division. There are reports describing a negative

influence of Endorem labelling on the cytoskeleton in rat and human MSCs using a labelling concentration of 600 µg/mL Fe [28].

In contrast to the unaffected osteogenic and adipogenic differentiation, after Endorem labelling fewer stem cells underwent chondrogenesis compared to a control. Other groups have come to a similar conclusion: a dose dependent inhibition of chondrogenesis in human cells was observed [29, 30]. In contrast, there are also reports about it lacking negative influence on cartilage formation in human cells [31]. We also observed signs of chondrogenesis in the negative control. This phenomenon has already been seen in bovine MSCs. Three-dimensional pellet formation can lead to spontaneous chondrogenesis [32].

It has been shown that human cells were able to proliferate normally after Endorem labelling [31, 33]. Using an MTT test and migration and wound healing assay we could demonstrate that the proliferation of the cells after labelling was not altered [34].

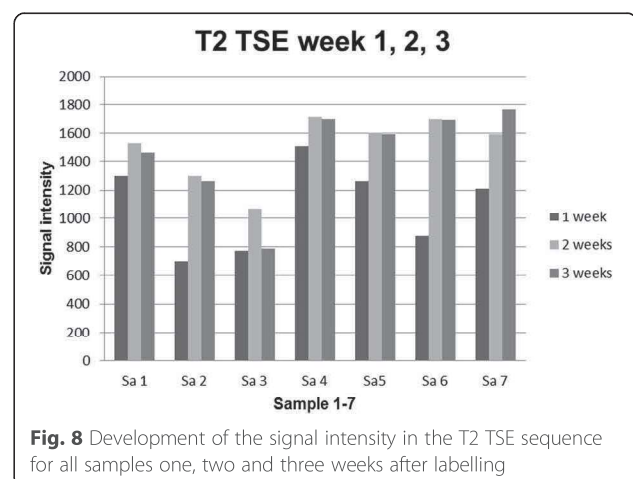
It could be shown in T2 TSE and T2 FFE sequences that the hypointensity caused by Endorem decreased within 3 weeks, but after this time a sufficient signal void could still be seen in the scans. However, the results of the statistical analysis between the percentage of labelled cells in the MACS test for 1, 2 and 3 weeks and the signal intensity in the T2 TSE and T2 FFE sequences for the same points in time showed no statistical correlation. A possible explanation could be that it is not the number of labelled cells but the intracellular distribution of the Endorem particles that is predominantly relevant. With the help of MACS test a differentiation between labelled and unlabelled cells can be made. However, the labelled fraction can also contain cells with a low particles' number. According to this fact that results in a high variation of the samples, a statistical correlation is not possible. We assumed that Endorem dissipates within canine ASCs within a 3 week period because of cell division and intracellular metabolism. The leakage of iron oxide from the cell to the medium was not investigated in this study but another author reported about this issue [18]. Even if the contrast agent is spontaneously released by the cells there is still enough signal void in T2 FFE and TSE caused by labelled cells after 3 weeks. However, this leakage could represent a limitation for in vivo tracking studies.

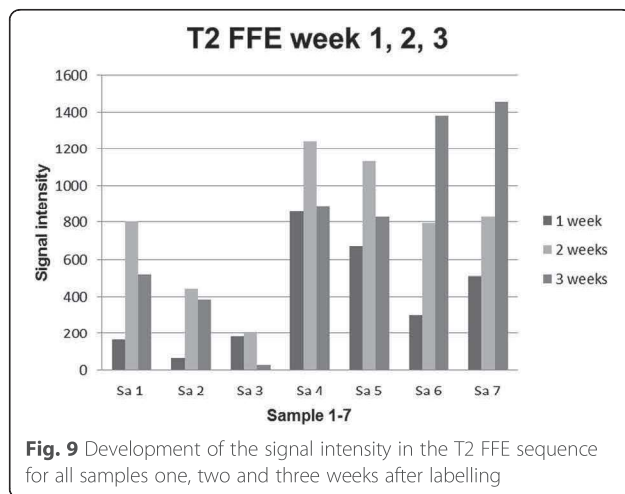
The limitation of the current study is the in vitro design. There might be a strong influence of the surrounding structures on the migration and imaging of cells in vivo. However, a few studies that present tracking of SPIO labelled cells in vivo in canine models exist. SPIO labelled canine MSCs administered into renal artery were detectable as hypointense areas in the renal cortex over 8 days at 3 Tesla [35]. Intra-arterial delivered SPIO labelled

MSCs in the canine stroke model were seen at least over 4 weeks period at 3 Tesla [36]. Also human SPIO labelled ASCs can migrate to the site of the lesion after radiofrequency ablation and differentiate into cardiomyocyte-like cells [37].

Because of the decreasing level of Endorem particles in the cells, we assumed that the degree of signal cancellation should decline within a 3 week period and signal increase should be noticed. However, for the 3 week period we observed a decrease in the signal intensity (Figs. 8 and 9). Considering the findings of the TEM investigation after 3 weeks that most Endorem particles were packed in the lysosomes (Fig. 4d) and not distributed within the cell could be the most probable explanation. As already mentioned, this could lead to a stronger signal void. Other studies have also reported that micro air deposits in the agar phantoms can cause artefacts and strengthen the hypointense signal [18]. However, we did not observe any air inclusions in the present study.

We chose T2 TSE and T2 FFE sequences and did not observe relevant differences in in vitro investigation in agar phantoms. In any case, other studies have shown the superiority of the T2 FFE for tracking studies in vitro and in vivo [18, 19, 38]. We decided to use also T2 TSE as this is a standard sequence superior to T2 FFE concerning the clinical use due to the clear depiction of the anatomy with high contrast between different soft tissues. The aim was to investigate whether the influence of the iron oxides is strong enough to influence also the T2 spin echo signal. The advantage of an investigation using the T2 TSE sequence would be the picture of the anatomy and assessment of the iron distribution at the same time. However, T2 FFE sequences are more sensitive regarding the paramagnetic properties of the iron oxide nanoparticles. This is why the T2 FFE sequence should be the method of choice to detect Endorem labelled stem cells.





Conclusion

An Endorem labelling concentration of 319.2 µg/mL Fe (448 µg/mL SPIO) had no adverse effects on the viability of canine ASCs. After a 3 week period of culture Endorem labelled ASCs were detectable with a 1 Tesla magnetic resonance tomograph in T2w TSE and T2wFFE sequences. Therefore, this contrast agent could be used as a model for iron oxide labelling agents. However, the tracking ability in vivo has to be evaluated in further studies. A potential influence on chondrogenesis should be further investigated.

Acknowledgements

Preliminary results were presented as an Abstract at the EVDI Annual Conference, Utrecht, 28-30 August 2014 and the 20th FECAVA Eurocongress, Munich, 6-9 November 2014.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article. If any additional material used and/or analysed during the current study is required, these are available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

MK carried out the collections of the stem cells, labelling, stainings and differentiation of the cells and drafted the manuscript. SA conceived of the study, participated in the design of the study and helped in the interpretation of the labelling, stainings, TEM and differentiation of the cells. MS coordinated the study and helped to draft the manuscript. CR participated in the design of the study, helped to perform the isolation, labelling of the cells, stainings and differentiation of the cells. MK (Martin Kramer) participated in the design of the study and helped in the interpretation of the MRI data. KF performed the statistical analysis. KVP conceived of the study and participated in its design and coordination of the MRI part, and helped to interpret the MRI data. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Ethics approval and consent to participate

According to the German law no ethic statement is required as samples were obtained through standard care. We used the fat tissue that depicts a waste product. Fat tissue was removed during the elective surgery in order to improve the intraoperative visibility of other organs and was supposed to be disposed as we stated in the manuscript.

Author details

¹Department of Veterinary Clinical Sciences, Clinic for Small Animal-Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany. ²Institute of Veterinary Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany. ³Institute of Biomathematics, Faculty of Veterinary Medicine, Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany.

Received: 4 August 2015 Accepted: 17 February 2017

Published online: 24 February 2017

References

- Aly LAA, El- Menoufy H, Ragae A, Rashed LA, Sabry D. Adipose stem cells as alternatives for bone marrow mesenchymal stem cells in oral ulcer healing. *International Journal of Stem Cells*. 2012;5:104-14.
- Alamoudi NM, El Ashiry EA, Farsi NM, El Derwi DA, Atta HM. Treatment of oral ulcers in dogs using adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Clin Pediatr Dent*. 2014;38:215.
- Filho ELR, de Araújo Larrazabal MC, Ferreira da Costa L, Monteiro dos Santos S, Monteiro dos Santos R, de Andrade Aguiar JL. Effect of autologous stem cells on regenerated bone during distraction osteogenesis by Ilizarov technique in the radius of dogs. *Histomorphometric analysis. Acta Cir Bras*. 2013;28:574-81.
- Koyanagi H, Ae K, Maehara H, Yuasa M, Masaoka T, Yamada T, Taniyama T, Saito M, Funouchi Y, Yoshii T, Okawa T, Sotome S. Massive bone reconstruction with heat-treated bone graft loaded autologous bone marrow-derived stromal cells and b-tricalcium phosphate composites in canine models. *J Orthop Res*. 2003;31:1308-11.
- Chen T, Wang Y, Bu L. Construction of functional tissue-engineered bone using cell sheet technology in a canine model. *Exp Ther Med*. 2014;7:958-62.
- Yun J-H, Han S-H, Choi S-H, Lee M-H, Lee S-J, Song S-U, Oh N. Effects of bone marrow derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on bone regeneration for osseointegration of dental implants: Preliminary study in canine three-wall intrabony defects. *Journal of Biomedical Materials B: Applied Biomaterials*. 2014;102B:1021-30.
- Black LL, Gaynor J, Gahring D, Adams C. Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. *Vet Ther*. 2007;8:273-84.
- Black LL, Gaynor J, Adams C, Dhupa S, Sams A. Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on clinical signs of chronic osteoarthritis of elbow joint in dogs. *Vet Ther*. 2008;9:192-200.
- Wood JA, Chung D-J, Park SA, Zwingerberger AL, Reilly CM, Ly J, Walker NJ, Vernau W, Hayashi K, Wisner ER, Canno MS, Kass PH, Cherry SR, Boyesson DL, Russel P, Murphy CJ. Periocular and intra-articular injection of canine adipose-derived mesenchymal stem cells: an in vivo imaging and migration study. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2012;28:307-17.
- Vilar JM, Batista M, Morales M, Santana A, Cuervo B, Rubio M, Cugat R, Sopena J, Carrillo JM. Assessment of the effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells in osteoarthritic dogs using a double blinded force platform analysis. *BMC Vet Res*. 2014;10:143.
- Lim J-H, Byeon Y-E, Ryu H-H, Jeong Y-H, Lee Y-W, Kim WH, Kang K-S, Kweon K-J. Transplantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in experimentally induced spinal cord injured dogs. *J Vet Sci*. 2008;8:275-82.
- Jung D-I, Ha J, Kang B-T, Kim J-W, Quan F-S, Lee J-H, Woo E-J, Park H-M. A comparison of autologous and allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in canine spinal cord injury. *Journal of Neurological Sciences*. 2009;285:67-77.
- Ryu H-H, Lim J-H, Byeon Y-E, Park J-R, Seo M-S, Lee Y-W, Kim WH, Kang K-S, Kweon O-K. Functional recovery and neural differentiation after transplantation of allogenic adipose-derived stem cells in a canine model of acute spinal cord injury. *J Vet Sci*. 2009;10:273-84.
- Penha EM, Santana Meira C, Teixeira Guimarães F, Pinheiro Mendonça MV, Gravelly FA, Bahia Pinheiro CM, Bahia Pinheiro TM, Barrouin-Melo SM, Ribeiro-dos-Santos R, PereiraSoares MB. Use of autologous mesenchymal stem cells derived from bone marrow for the treatment of naturally injured spinal cord in dogs. *Hindawi Publishing Corporation Stem Cells International*; 2014. p. 1-8.
- Chung D-J, Choi C-B, Lee S-H, Kang E-H, Lee J-H, Hwang S-H, Han H, Lee JH, Choe BY, Lee S-Y, Kim H-Y. Intraarterially delivered human umbilical cord

- blood-derived mesenchymal stem cells in canine cerebral ischemia. *J Neurosci Res.* 2009;87:3554–67.
16. Weissleder R, Elizondo G, Wittenberg J, Rabito CA, Bengele HH, Josephson L. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: characterisation of a new class of contrast agents for MR imaging. *Radiology.* 1999;175:489–93.
 17. Shapiro EM, Skrtic S, Koretsky AP. Sizing it up: cellular MRI using micron-sized iron oxide particles. *Magn Reson Med.* 2005;53:329–38.
 18. Küstermann E, Himmelreich U, Kandal K, Geelen T, Ketkar A, Wiedermann D, Strecker C, Esser J, Arnhold S, Hoehn M. Efficient stem cell labeling for MRI studies. *Contrast Media and Molecular Imaging.* 2008;3:27–37.
 19. Nohroudi K, Arnhold S, Berhorn T, Addicks K, Hoehn M, Himmelreich U. In vivo MRI stem cell tracking requires balancing of detection limit and cell viability. *Cell Transplant.* 2008;19:431–41.
 20. Sykova E, Jendelova P. Migration, fate and in vivo imaging of adult stem cells in the CNS. *Cell Death Differ.* 2007;14:1336–42.
 21. Bulte JWM. In vivo MRI cell tracking: clinical studies. *Am J Roentgenol.* 2009;193:314–25.
 22. Reich CM, Raabe O, Wenisch S, Bridger PS, Kramer M, Arnhold S. Isolation, culture and chondrogenic differentiation of canine adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells – a comparative study. *Veterinary Research Communication.* 2012;36:139–48.
 23. Sykova E, Jendelova P. Magnetic resonance tracking of transplanted stem cells in rat brain and spinal cord. *Neurodegenerative Diseases.* 2006;3:62–7.
 24. Urdzikova L, Jendelova P, Glogarova K, Burian M, Hajek M, Sykova E. Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rat. *J Neurotrauma.* 2006;23:1379–91.
 25. Kedziorek DA, Kraitchman DL. Superparamagnetic iron oxide labeling of stem cells for MRI tracking and delivery in cardiovascular disease. *Methods Mol Biol.* 2010;660:171–83.
 26. Thorek DLJ, Tsourkas A. Size, charge and concentration dependent uptake of iron oxide particles by non-phagocytic cells. *Biomaterials.* 2008;29:3583–90.
 27. Politi LS, Bacigaluppi M, Brambilla E, Cadioli M, Falini A, Comi G, Scotti G, Martino G, Pluchino S. Magnetic resonance-based tracking and quantification of intravenously injected neural stem cell accumulation in the brains of mice with experimental multiple sclerosis. *Stem Cells.* 2007;25:2583–92.
 28. Seonen SJH, Himmelreich U, Nuytten N, De Cuyper M. Cytotoxic effects of iron oxide nanoparticles and implications for safety in cell labeling. *Biomaterials.* 2011;32:195–205.
 29. Bulte JWM, Kraitchman DL, Mackay AM, Pittenger M. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells is inhibited after magnetic labelling with ferumoxides. *Blood.* 2004;104:3410–3.
 30. Kostura L, Kraitchmann DL, Mackay AM, Pittenger MF, Bulte JWM. Feridex labeling of mesenchymal stem cells inhibits chondrogenesis but not adipogenesis or osteogenesis. *NMR Biomedicine.* 2004;17:513–7.
 31. Arbab AS, Yocum GT, Kalish H, Jordan EK, Anderson SA, Khakoo AY, Read EJ, Frank JA. Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI. *Blood.* 2004;104:1217–23.
 32. Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, Ishiguro T, Okumura M, Iwanaga T, Kadosawa I, Fujinaga T. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells in pellet cultural system. *Exp Hematol.* 2004;32:502–9.
 33. Frank JA, Miller BR, Arbab AS, Zywicke HA, Jordan EK, Lewis BK, Bryant LH, Bulte JWM. Clinically applicable labeling of mammalian stem cells by combining superparamagnetic iron oxides and transfection agents. *Radiology.* 2003;228:480–7.
 34. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Assays.* 1983;65(1-2):55–63.
 35. Yoo JH, Park C, Jung D-I, Lim C-Y, Kang B-T, Kim JH, Park JW, Kim JH, Park HM. In vivo cell tracking of canine allogenic mesenchymal stem cells administration via renal arterial catheterization and physiopathological effects on the kidney in two healthy dogs. *J Vet Med Sci.* 2011;73(2):269–74.
 36. Lu S-S, Liu S, Zu Q-Q, Xu X-Q, Yu J, Wang J, Zhang Y, Shi H. In vivo MR imaging of intraarterially delivered magnetically labeled mesenchymal stem cells in a canine stroke model. *PLoS One.* 2013;8:2.
 37. Kim U, Shin DG, Park JS, Kim YJ, Park SI, Moon YM, Jeong KS. Homing of adipose-derived stem cells to radiofrequency catheter ablated canine atrium and differentiation into cardiomyocyte-like cells. *Int J Cardiol.* 2011;146:371–8.
 38. Ittrich H, Lange C, Dahnke H, Zander AR, Adam G, Nolte-Ernsting C. Untersuchung zur Markierung von mesenchymalen Stammzellen mit unterschiedlichen superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln und Nachweisbarkeit in der MRT bei 3 T. *Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren.* 2005;177:1151–63.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



MRI Tracking of Iron Oxide Labelled Canine Mesenchymal Stem Cells in Artificial Stifle Defects

Kerstin von Pueckler¹ Karen John¹ Martin Kramer¹ Jan Bokemeyer² Stefan Arnhold³

¹Department of Veterinary Clinical Science, Small Animal Clinic, Justus Liebig University, Gießen, Germany

²Tierklinik Kalbach – Fachklinik für Kleintiere Frankfurt, Frankfurt am Main, Germany

³Institute of Veterinary Anatomy and Embryology, Justus Liebig University, Gießen, Germany

Address for correspondence Kerstin von Pueckler, DVM, DipECVDI, Department of Veterinary Clinical Science, Small Animal Clinic, Justus Liebig University, Frankfurter Straße 108, 35392 Gießen, Germany (e-mail: Kerstin.h.Pueckler@vetmed.uni-giessen.de).

Vet Comp Orthop Traumatol 2022;35:362–369.

Abstract

Objectives The aim of this study was to describe ultrasmall superparamagnetic iron oxides labelling of canine adipose-derived mesenchymal stem cells (AdMSCs) and the detection and semiquantitative evaluation of the labelled cells after implantation in artificial canine stifle defects using magnetic resonance imaging.

Methods Magnetic resonance imaging examinations of 10 paired ($n = 20$) cadaveric stifle joints were evaluated after creation of chondral defects and embedding of ultrasmall superparamagnetic iron oxides labelled canine mesenchymal stem cells. To prove the feasibility of the labelling for *in vivo* usage, Prussian blue staining, cell vitality tests and intralesional administration of labelled cells were conducted. Magnetic resonance imaging of *ex vivo* defects filled with different cell concentrations was obtained to depict the cell content semiquantitatively via signal intensity measurements (region of interest).

Results Prussian blue staining showed that the labelling was effective. According to the vitality tests, it had no significant short-term influence on cell viability and proliferation rate. For the evaluation of the defect T2* sequences were feasible and stifle defects were visible allowing measurements of the signal intensity in all cases. Increasing the cell concentration within the chondral defects resulted in an inversely proportional, significant reduction of signal intensity according to the region of interest.

Clinical Significance Ultrasmall superparamagnetic iron oxides labelling was effective. The detection of the AdMSCs in a complex anatomical structure like the surface of the femoral condyle was possible and the T2* signal intensity of the implant region was significantly correlated with the concentration of the AdMSCs.

Keywords

- ▶ stem cell
- ▶ MRI
- ▶ tracking
- ▶ dog
- ▶ iron oxide

Introduction

During the last decades, stem cell therapy has gained increasing importance in human and veterinary medicine. It represents a promising approach for the regenerative

treatment of a large number of degenerative diseases.^{1,2} The isolation of canine mesenchymal stem cells has been reported and standard procedures have been established.¹ Mesenchymal stem cells are commonly used because they are multipotent cells with the ability to differentiate into

received
June 30, 2021
accepted after revision
May 4, 2021
published online
July 5, 2022

© 2022, Thieme. All rights reserved.
Georg Thieme Verlag KG,
Rüdigerstraße 14,
70469 Stuttgart, Germany

DOI <https://doi.org/10.1055/s-0042-1750432>.
ISSN 0932-0814.

various cell types through osteogenic, chondrogenic, adipogenic and myogenic differentiation.¹ Although small animal studies using rats and mice are available, there is only limited information about stem cell application in dogs and cats so far.² However, stem cell treatment offers hope regarding many degenerative and inflammatory diseases of the neural system and appendicular skeleton in veterinary medicine. Furthermore the application in dogs could be a feasible model for human medicine.² The treatment of cartilage defects with mesenchymal stem cells is amongst the most favoured therapy approaches for the regeneration of hyaline cartilage and constitutes the focus of ongoing research projects.^{3–5} However, cartilage defects such as osteochondrosis and osteoarthritis still represent a special therapeutic challenge.^{6–8} Several studies reported that novel therapies including mesenchymal stem cell application can lead to an almost normal function of the joint.^{3,4,7–9} Although the new treatment seems to be promising, there is only little information available about the fate and migration of the stem cells in the organism after transplantation.^{10,11} Several studies discuss the possibility that stem cells quickly leave the site of application and solely paracrine factors may be helpful components in stem cell treatment.^{12,13}

To solve the question of stem cell migration and fate, studies elaborate labelling of stem cells for diagnostic imaging. Different methods have been used in the past including radiopharmaceutical labelling and labelling with iron oxide particles.^{14–16} Labelling should be easy, efficient and non-toxic for the cells and the patient.^{14,16}

The objective of the present prospective *ex vivo* study was to evaluate ultrasmall superparamagnetic iron oxides (USPIO) (Endorem, Guerbet, Roissy, France) labelling of canine mesenchymal stem cells in combination with magnetic resonance imaging (MRI) to detect canine mesenchymal stem cells in a complex anatomical structure such as the canine stifle combined with small cartilage defects. Furthermore, a model that could serve as an example for the treatment of canine osteochondrosis and non-invasive monitoring of the treatment under clinical conditions in veterinary medicine was evaluated. This includes detectability, viability and proliferation of the cells. Final goal of the present prospective study is to provide a model for the clinical use of adipose-derived mesenchymal stem cells (AdMSCs) in cartilage defects in canine patients.

Materials and Methods

Specimen

Ten paired ($n=20$) cadaveric hindlimbs of 10 dogs, which were euthanized due to diseases non-related to the appendicular skeleton, were collected. Inclusion criteria consisted of body weight between 20 and 40 kg, no history of hind limb lameness and unremarkable stifle radiographs. After euthanasia and disarticulation, the hind limbs were stored at -20°C until the beginning of the implantation of the AdMSCs.

For the selection of the stifle joints, mediolateral and craniocaudal radiographs were obtained and evaluated by a board-certified radiologist (KP). Additionally, the stifle joints were evaluated macroscopically after preparation of the joint via a lateral approach prior to implantation of the AdMSCs (JB, KJ).

Collection and Culture of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells

Fat was collected from five dogs, all younger than 2 years of age, that had abdominal surgery. The abdominal fat was resected to increase the visibility of abdominal organs under sterile conditions during abdominal surgery not related to this study. The fat was collected with permission from the owner before it was discarded.

After collection, AdMSCs were prepared from the fatty tissue samples using a standard isolation protocol.² The AdMSCs were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco life technologies, Carlsbad, CA) with 10% foetal bovine serum (PAA, Pasching, Austria) and 1% penicillin/streptomycin (ApploChem, Darmstadt, Germany) at 37°C and 5% CO_2 at a concentration of 250×10^3 cells per cm^2 (P0, Passage 0). The AdMSCs were passaged one time and cryopreserved in freezing medium as P1 (first passage) at -80°C . For all parts of the present study the first passage of the AdMSCs was used. The cells underwent cryoconservation at -196°C after successive cooling of the cells for 24 hours.

Prior to labelling, thawing of the AdMSCs was conducted using a water bath at 37°C . After thawing the cells were resuspended in standard medium and cultured at 37°C and 5% CO_2 .

Labelling and Viability

After thawing, AdMSCs were cultured for 5 days and subdivided in two parts representing positive and negative control on day 6. Half of the AdMSCs were incubated with 283 μL of USPIO as reported in a previous study.¹⁶ After 24 hours of incubation, cells were washed with PBS buffer and resuspended.

Labelling efficiency was subjectively evaluated using Prussian blue staining as previously described.¹⁶ After staining, the percentage of labelled AdMSCs was evaluated using light microscopy. Viability of the cells was shown using phalloidin staining for labelling the cytoskeleton using fluorescent microscopy. Additionally, an MTT-test (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide test) was conducted as a test for detecting cytotoxicity on day 0, 1, 2 and 3 after labelling. The MTT is a colorimetric assay and a quantitative indicator for cell viability. Life Cell Imaging was conducted for 24 hours to document cell migration, proliferation and cell viability. The technique allows the assessment of dynamic changes in real time.

Finally, transmission electron microscopy was used to show the location of the USPIO particles within the cells.

Selection and Preparation of Stifle Defects

Limbs were assigned a code for each part of the study to ensure an unbiased evaluation by all observers. The stifles

Table 1 Scanning parameters

Sequence		TR (ms)	TE (ms)	Matrix	FOV	Slice (mm)
T1-weighted TSE	Sagittal	22	500	320	190	2
T2-weighted TSE	Dorsal	60	1490	288	150	2
T2 3D GE	Sagittal	10	20	256	160	3
T2 3D GE	Sagittal	10	20	288	160	2
T2-weighted SPAIR	Dorsal	60	2,600	512	190	2
PD-weighted	Sagittal	11	1,500	304	190	2
3D Wats	Transverse	13	25	256	150	2

Abbreviations: FOV, field of view; GE, gradient echo, PD, proton density; SPAIR, spectral fat saturation; TE, time to echo; TR, time of repetition; TSE, turbo spin echo; Wats, water selective.

and AdMSCs of different dogs were randomly assigned to each other using a random matrix (► **Supplementary Appendix Table 1**, available in the online version). After thawing over 12 hours at room temperature, the stifles were warmed in a water bath at 34°C (EHEIM GmbH u. Co KG, Deizisau, Germany). The stifle was prepared surgically with a lateral approach. A defined defect was created in the cartilage of the caudomedial aspect of the lateral condyle using a cylindrical drill with a 5.6mm diameter and full cartilage thickness (HSS Emil Lux GmbH u Co, Germany). The defect was flushed with saline.

Implantation

After labelling, AdMSCs were suspended and centrifugated in a falcon tube at 260 g for 5 minutes. The pellet was resuspended in 1 mL Dulbecco's Modified Eagle's Medium. Four Eppendorf tubes with 0.9 mL suspension with four different concentrations of labelled cells were prepared (► **Supplementary Appendix Table 1**, available in the online version).

Collagen-NF and 20GNL were thawed at 6°C. Directly before implantation, 100 µL 20GNL was mixed with 900 µL cell suspension in a relation of 1 (GNL):10 (cells) to create a volume of 1 mL.

This syringe with 1 mL of the suspension and a 1 mL syringe filled with Collagen-NF were fixed in a Twin-Syringe

Dispenser (Amedrix, Esslingen, Germany). The syringes were connected via a Single Use Adapter (Amedrix, Germany). A Single Use Mixer (Amedrix, Germany) was placed at the tip in combination with an 18 G cannula (Neoject × 1.20mm × 40 mm) (Dr. Junghans GmbH, Germany) (► **Fig. 1**).

The defect was filled with the prepared collagen gel (► **Fig. 2**). Due to the temperature of the warmed stifle, the gel hardened within 5 minutes. During this time, the stifle was fixed in a stable horizontal position. After hardening of the collagen gel, the joint was closed with continuous sutures of polydioxanone and single sutures for the facial plane. The skin was closed with single sutures using monofilament polyamide. The joint was flushed with a minimum of 500 mL of sterile saline (37°C) in flexion and extension of the stifle to reduce gas inclusions.

Magnetic Resonance Imaging

The prepared stifles were examined with a 1 Tesla MR-scanner (Gyrosan Intera Philips Healthcare, the Netherlands) and a small surface coil (C3). Stifles were horizontally positioned in lateral recumbency, feet first and an approximate flexion of 90 degrees at the isocentre of the scanner comparable to a typical setting in clinical cases. The position of the stifles was recorded and repeated in this standardized approach for all stifles. The surface coil



Fig. 1 Twin-Syringe Dispenser (Amedrix, Germany). Syringes connected via a Single Use Adapter (Amedrix, Germany) and a Single Use Mixer (Amedrix, Germany) at the tip.



Fig. 2 Artificial defect in of the condyle after filling with the labelled stem cells embedded in collagen-gel.

was positioned on the lateral aspect of the stifle. ► **Table 1** gives an overview of the scanning protocol. The orientation of the slices was chosen as follows: the chondral defect had to be pictured at least two times per sequence with one slice in the central aspect of the defect at its maximum extent. Slices were oriented along the axis of the femoral condyles in sagittal and dorsal scans.

Image Interpretation

The measurements were performed independently by the same observer twice (KJ) in two separate sessions. For the estimation of the signal intensity, a dedicated software (OsiriX 4.1.2, Pixmeo, Geneva, Switzerland) was used. The signal intensity was measured for every specimen in the different sequences. For this purpose, a flexible region of interest (ROI) was placed in every defect. The software provided signal intensity units and also maximal, minimal and mean values of the units including the standard deviation and the surface area. The observer was blinded for the cell concentration in the defect. Questionable findings were discussed (KJ, KP) and a consensus opinion was achieved. The mean of the absolute value of the signal intensity between the two series of measurements, standard deviation of the difference, maximal difference and intraclass correlation coefficient were calculated.

The localization of the artificial defect was reported in all sequences by subdividing the articular surface of the lateral condyle in three different areas (1,2,3). On sagittal images, the cranial part was assigned '1', the mid-aspect '2' and the caudal part '3'. On dorsal images the medial part was assigned '1', the mid-aspect '2' and the lateral part '3'. This was reported to ensure that the defect placement was consistent.

Measurement 1 was performed assessing the signal intensity and outline of the defect filled with collagen and labelled AdMSCs. The signal intensity of the gel was quantified on sagittal views using the image that showed the largest extent of the defect. A hand drawn ROI was obtained by following the bone surface and articular surface of the defect using the dedicated software (OsiriX 4.1.2, Pixmeo, Geneva, Switzerland). The ROI was copied and a second measurement 'outside the patient', same level as the defect, was obtained to represent background noise of the magnetic field of the scanner. Medium signal intensity, standard deviation, minimum and maximum value were recorded for both regions. The second measurement (background) was used to correct data of the first measurement (stifle defect) for noise and field inhomogeneities. The correction was performed by a modification of the z-score calculating the mean value for every pixel of the defect and the background area respectively. The defect values were divided by the background values to correct the signal intensity for noise.¹⁷

Measurement 2 was conducted using a subjective selection of the collagen gel without tracing the bony surface and included solely areas with gel. Gas bubbles or filling defects of the gel were excluded by these measurements and data were also corrected for noise and field inhomogeneity. Medium signal intensity, standard deviation, minimum and maximum value were recorded for both regions.

The biometric planning of the study was conducted in collaboration with the Institute for Biomathematics (Institute for Biomathematics and data processing, FB10 Justus Liebig University). The statistical power of the sample size was calculated using the software BMDP Dynamic, Release 8.1 (Statistical Solutions Ltd., Cork, Ireland).

For the basic statistical analyses, a dedicated software was used (Microsoft Office Excel [Microsoft Corporation]). A Student-*t*-test (Welch test) was used to test the data. The Welch test was used to evaluate the correlation of signal intensities and the cell concentrations because an unequal distribution was observed. Additionally, Pearson's correlation was conducted to evaluate on the one hand the correlation of labelling concentration and signal intensities and on the other hand the influences of the labelling on cell proliferation and viability. A *p*-value of 0.05 was considered to be statistically relevant.

Results

Twenty stifles from 10 dogs entered the study after evaluation of the stifle radiographs by one observer (KP). Macroscopic evaluation of the stifles after opening showed no abnormalities (JB, KJ). The preparation of the stifle defect and implantation of the AdMSCs embedded in collagen was also successful in all cases.

Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Labelling, Viability, Proliferation

Prussian Blue Staining showed an efficient labelling of the AdMSCs. After 24 hours of incubation, a marked uptake of iron oxides at an applied concentration of 308 µg Fe/mL medium was present. All examined samples showed a labelling of all cells. However, the labelling efficiency was heterogenous: some cells showed only mild uptake, while others contained more particles in the cytoplasm as could be detected light-microscopical detection of the Prussian blue staining. Light microscopy did not reveal any hint for an impairment of cell morphology. Subjectively, the labelling had no negative effects and cell viability was within normal limits. Phalloidin staining detecting β-actin filaments revealed a normal cytoskeleton in all positive and negative samples.

The MTT test was conducted at four different time points (day 0,1,2,3,). No significant difference between labelled and unlabelled cells was detected (*p* = 0.0034). However, the MTT test showed significant differences between different cell populations obtained from different donors (*p* = 0.278). The Pearson correlation coefficient for cell population and proliferation was high with *r* = 0.87.

Transmission electron microscopy showed iron oxide particles in the cytoplasm and organelles of all examined AdMSCs. Small amounts of iron oxide particles were also detected in lysosomes.

Magnetic Resonance Imaging

The artificial defect was visible and well defined in all cases. Using the above-described method to describe the localization of the artificial defect, on sagittal images most of the

defects were located in the mid aspect of the condyle (assigned '2'). On dorsal images, most of the defects were located between the medial and central part of the condyle. The localization of the defect was almost constant with a mean of 1.92 (± 0.16) in the centre on sagittal and with a mean of 1.39 (± 0.26) in dorsal images. The mean defect size in transverse images was 0.365 (± 0.084) cm². On sagittal T2-weighted images, the defect size was 0.137 cm² (± 0.027 cm²) (**► Fig. 3**).

Eleven of 20 defects showed small roundish and well-defined areas of signal loss within the embedded gel indicative for small gas inclusions. Two of the 20 defects (7 and 19) showed an incomplete filling with a small concave shaped indentation of the gel surface.

Measurement 1 was performed including the entire size of the defect on T2-weighted gradient echo sequences in sagittal orientation. Additionally, the signal was normalized for noise using the same measurements outside the patient at the same level. The intensity of the negative control (gel and AdMSCs without labelling) showed a mean of 65.33 (± 17.87) units. The lowest concentration of labelled cells showed a mean intensity of 46.83 (± 31.00) units, while the gradually higher concentrations showed a mean intensity of 67.13 (± 34.02) units and 51.97 (± 22.88) units respectively.

The analysis of variance using Welch *t*-test and Pearson correlation test showed no significant link between the normalized mean values and the embedded cell concentration.

Measurement 2 was performed subjectively and gas bubbles or filling defects were excluded from this measurement. Additionally, the signal was normalized for noise using the same measurements 'outside the patient' at the same level. The intensity of the negative control (gel and cells without labelling) showed a mean of 83.11 (± 19.13) units. The lowest concentration of AdMSCs showed a mean intensity of 65.5

(± 20.23) units, while stepwise higher concentrations showed a mean intensity of 51.44 (± 7.15) and 39.87 (± 10.85) units. The signal intensity decreased with increasing concentration of the AdMSCs significantly with $p = 0.016$ (**► Figs. 4 and 5**).

Discussion

The present study shows that iron oxide labelled AdMSCs are semiquantitatively detectable in artificial canine stifle defects via MRI using a subjective ROI placement on T2* weighted sequences. The use of a cadaver model before bringing the labelled AdMSCs into clinical application is beneficial for the standardization of implantation and scanning protocols and builds the basis for the clinical application. Our aim was to provide a model that could be directly transferred to the treatment of various cartilage defects of the stifle in dogs using collagen embedded labelled AdMSCs.

AdMSCs culture and labelling have been reported before. We used USPIO for the labelling of the AdMSCs because it is reported to label efficiently and to have no negative influences on cell viability and proliferation. Compared with other iron oxides USPIO represents the advantage to identify the labelling efficiency by light microscopy, while nanoparticles can only be identified with the use of transmission electron microscopy. This could also be confirmed in the present study. The disadvantage of USPIO is the subsequent loss of the stem cell labelling *in vivo* due to the cell proliferation and exocytosis of the particles.¹⁶ In the present study, it was possible to prove the detectability of small amounts of USPIO after implantation. This finding is promising for the detection after implantation in stifle joints in clinical cases, where a reduction in the labelling efficiency by the above-mentioned effects is expected.¹⁶

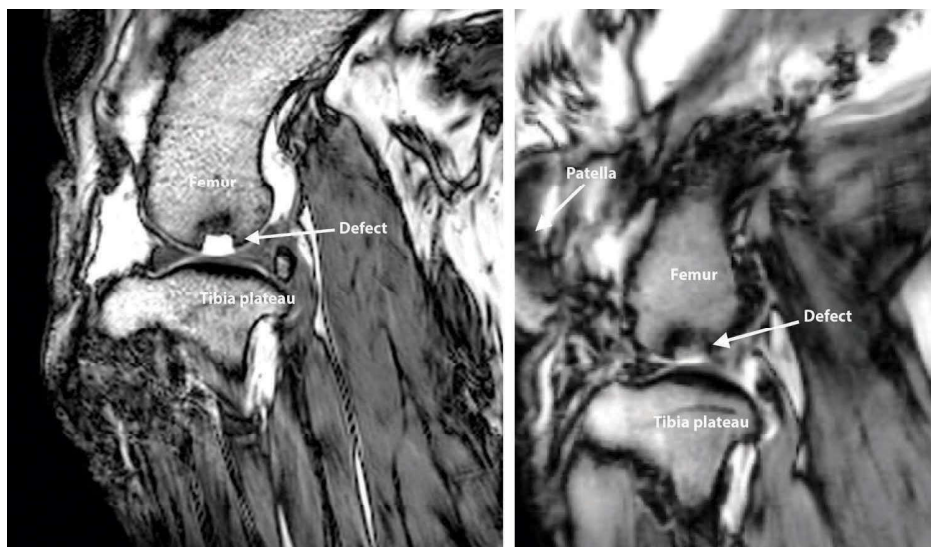


Fig. 3 Mid-sagittal magnetic resonance imaging of the stifle defects in T2*-weighted: (A) The negative control (gel without adipose-derived mesenchymal stem cells) shows a homogeneously hyperintense signal in the defect. (B) The defect filled with the lowest concentration 0.5×10^5 cells) on the right shows homogenous mild signal loss.

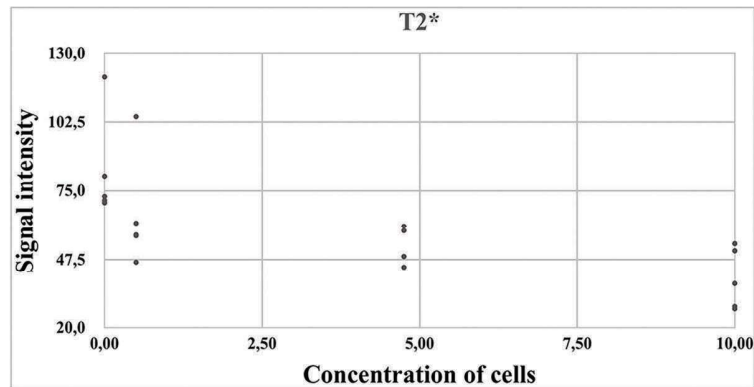


Fig. 4 Absolute signal intensity measurement (in T2 gradient echo) of the four different concentrations of ultrasmall superparamagnetic iron oxides. Expressed in intensity units by the evaluation software (OsiriX).

The number of included specimens was considered sufficient for the purpose of this study based on the analysis of the statistical power. However, the assessment of a larger group of stifles completed by histopathological examinations of the defect after scanning could have been beneficial. The MR examination with susceptibility weighted imaging was supported by a standard examination protocol of the stifle with spin echo sequences to exclude pathologies and to improve the anatomic visualization of the defect and guide the placement of the ROI.

Using five different donors for the AdMSCs reflected a typical clinical setting but introduced, at the same time, an additional variable. The cell viability and proliferation of the different donors differed significantly and had a higher impact on these parameters than the USPIO particles. Using a single donor could have led to higher significance of the scanning results. However, this would not reflect the typical clinical setting. In clinical cases, this individual influence should be taken into account.

The present study showed that labelling had no negative effect on the proliferation of the cells. Nevertheless, a limitation of the present study is the lack of tests showing their chondrogenic differentiation because previous studies reported that at higher concentrations the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells may be impaired.^{16,18,19} This is mainly true for higher USPIO concen-

trations and in combination with Poly L Lysin used for the labelling.

In contrast, other studies showed that the labelling with USPIO had no negative effect on the chondrogenic differentiation of equine and ovine AdMSCs.²⁰ We used a low USPIO concentration without Poly L Lysin and, therefore, an influence is less likely.

The present study showed that the implantation of labelled AdMSCs combined with collagen is possible. The collagen gel ensures that the AdMSCs initially stay in place and an impairment of the viability was not detected.

For the signal intensity measurements, the T2* sequence was used because previous studies underlined the reliability of the signal intensity measurements after application of USPIO.^{16,20}

This can be explained by the characteristic negative contrast of the iron oxide particles causing a distortion of the local magnetic field leading to a signal loss. Because of this special sensitivity of the T2* sequence for susceptibility artifacts the sequence was chosen. The advantage of the sequence regarding its sensitivity for the iron oxides is a disadvantage at the same time because artificial local magnetic field distortions, for example, gas, are known to create artificial hypointensities in this sequence (► Fig. 6).

Measurement 1 showed no significant correlation between the T2* signal intensity of the defect and the cell

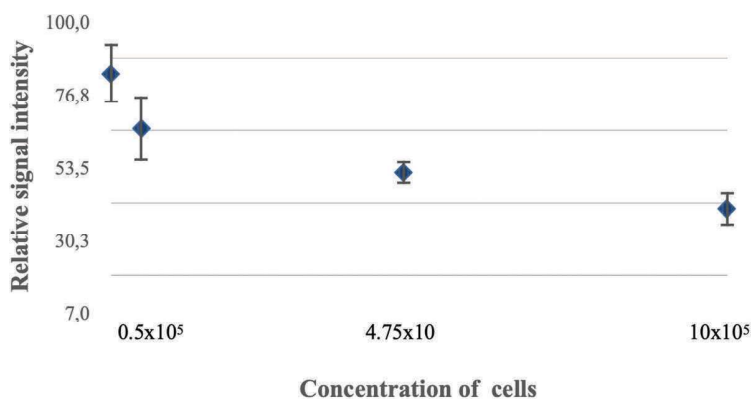


Fig. 5 Relative signal intensity measurement (in T2 gradient echo) of the four different concentrations of ultrasmall superparamagnetic iron oxides represented by the absolute mean value normalized by the mean value of the background area.



Fig. 6 Mid-sagittal T2 weighted magnetic resonance image of the stifle defect. The round hypointense area in the center of the defect is caused by small gas inclusions.

concentration embedded. As the placement of the ROI included the bone surface and various gas inclusions, it is likely that the signal intensity was impaired by different artifacts. The initial signal reduction between the negative control (concentration 0) to the smallest concentration of stem cells (0.5×10^5) seems to reflect the typical signal behaviour for iron oxide labelling, while the remainder of the signal intensity measurements showed higher signal intensities although the cell concentration was higher. The impairment of signal intensity measurements by small gas inclusions has been reported previously.^{16,21} Unfortunately, the usage of the collagen gel in the present study leads in several cases to gas inclusions, although the filling of the defect was performed carefully. Additionally, very high standard deviations of the signal intensity were recorded in measurement 1 underlining the lack of reliability of the values.

Measurement 2 avoided gas inclusions and included solely the region of the embedded material. The decrease in signal intensity was significantly correlated to the stem cell concentration with $p = 0.016$. Regarding the standard deviation in measurement two smaller values were recorded leading to more reliable results. However, further studies are needed to investigate the inter- and intra-observer repeatability of this measurement.

Although we reduced various influences on the signal intensity measurements by standardizing the positioning of the specimen using a standardized scanning protocol, the present study does not provide absolute signal intensity values applicable in all MRI scanners and patients. As signal

intensities in MRIs represent arbitrary scanner specific and individual units, the values cannot be directly transferred to other settings. Different approaches to intensity normalization in brain imaging have been reported elsewhere to achieve biologically interpretable units. Further investigations are necessary to establish a system that is applicable to musculoskeletal imaging.^{17,22,23}

A limitation of the present study is the *ex vivo* design. There might be an influence of the surrounding structures on the migration and imaging of cells *in vivo*. However, some studies showed that tracking of USPIO labelled cells *in vivo* in canine patients is possible.^{24,25} Another limitation of MRI of USPIO labelled AdMSCs is the fact that particles may leave the cells via exocytosis.¹⁶ In addition, the differentiation of the cells (e.g. chondrogenic) is not depicted by the technique presented in the present study. Further research including the labelling of surface cell markers *in vivo* is necessary.

In conclusion, AdMSCs labelling was efficient and the tracking via MRI using subjective ROI measurements is promising. Therefore, the results of the study can build a basis for controlled pre-clinical and clinical application of stem cells in canine orthopaedic diseases, for example in the treatment of canine osteochondrosis and cartilage defects.

Authors' Contribution

K.V.P., K.J. and S.A. contributed to the conception of study, study design, acquisition of data, data analysis and interpretation, drafting or revising of manuscript, approval of submitted manuscript and are publicly accountable for relevant content. M.K. and J.B. contributed to the conception of study, study design, data analysis and interpretation, drafting or revising of manuscript, approval of submitted manuscript and are publicly accountable for relevant content.

Funding

None.

Conflict of Interest

None declared.

Acknowledgements

We thank Manuela Heimann, Malte Pollmann, and Ella Wenz for technical support.

References

- 1 Meyer-Lindenberg A, Kilchling T. [Use of mesenchymal stemcells in dogs]. *Tierarztl Prax Ausg K Klientiere Heimtiere* 2018;46(06): 416–425
- 2 Arnhold S, Wenisch S. Adipose tissue derived mesenchymal stem cells for musculoskeletal repair in veterinary medicine. *Am J Stem Cells* 2015;4(01):1–12
- 3 Liu Y, Chen F, Liu W, et al. Repairing large porcine full-thickness defects of articular cartilage using autologous chondrocyte-engineered cartilage. *Tissue Eng* 2002;8(04):709–721
- 4 Guo X, Wang C, Zhang Y, et al. Repair of large articular cartilage defects with implants of autologous mesenchymal stem cells seeded into β -tricalcium phosphate in a sheep model. *Tissue Eng* 2004;10(11-12):1818–1829

- 5 Kazemi D, Shams Asenjan K, Dehdilani N, Parsa H. Canine articular cartilage regeneration using mesenchymal stem cells seeded on platelet rich fibrin: macroscopic and histological assessments. *Bone Joint Res* 2017;6(02):98–107
- 6 Olsson SE. Pathology, morphology, and clinical signs of osteochondrosis in the dog. In: Bojrab MJ, Bloomberg M, Smeak D. eds. *Disease Mechanisms in Small Animal Surgery*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1993:777
- 7 Jackson DW, Scheer MJ, Simon TM. Cartilage substitutes: overview of basic science and treatment options. *J Am Acad Orthop Surg* 2001;9(01):37–52
- 8 Thiede RM, Lu Y, Markel MD. A review of the treatment methods for cartilage defects. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2012;25(04):263–272
- 9 Kim SE, Pozzi A, Yeh JC, et al. Intra-articular umbilical cord derived mesenchymal stem cell therapy for chronic elbow osteoarthritis in dogs: a double-blinded, placebo-controlled clinical trial. *Front Vet Sci* 2019;6:474
- 10 Tobias KM, Johnston SA. *Veterinary Surgery Small Animal*. St. Louis, Mo: Saunders Elsevier; 2012
- 11 Kon E, Filardo G, Roffi A, Andriolo L, Marcacci M. New trends for knee cartilage regeneration: from cell-free scaffolds to mesenchymal stem cells. *Curr Rev Musculoskelet Med* 2012;5(03):236–243
- 12 Huňáková K, Hluchý M, Špaková T, et al. Study of bilateral elbow joint osteoarthritis treatment using conditioned medium from allogeneic adipose tissue-derived MSCs in Labrador retrievers. *Res Vet Sci* 2020;132:513–520
- 13 Brondeel C, Pauwelyn G, de Bakker E, Saunders J, Samoy Y, Spaas JH. Review: Mesenchymal stem cell therapy in canine osteoarthritis research: “Experientia docet”. *Front Vet Sci* 2021;8:668881
- 14 Spriet M, Hunt GB, Walker NJ, Borjesson DL. Scintigraphic tracking of mesenchymal stem cells after portal, systemic intravenous and splenic administration in healthy beagle dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 2015;56(03):327–334
- 15 Barthélémy I, Thibaud JL, de Fornel P, et al. In vivo stem cell tracking using scintigraphy in a canine model of DMD. *Sci Rep* 2020;10(01):10681
- 16 Kolecka MA, Arnhold S, Schmidt M, et al. Behaviour of adipose-derived canine mesenchymal stem cells after superparamagnetic iron oxide nanoparticles labelling for magnetic resonance imaging. *BMC Vet Res* 2017;13(01):62
- 17 Carré A, Klausner G, Edjlali M, et al. Standardization of brain MR images across machines and protocols: bridging the gap for MRI-based radiomics. *Sci Rep* 2020;10(01):12340
- 18 Kostura L, Kraitchman DL, Mackay AM, Pittenger MF, Bulte JWM. Feridex labeling of mesenchymal stem cells inhibits chondrogenesis but not adipogenesis or osteogenesis. *NMR Biomed* 2004;17(07):513–517
- 19 Bulte JW, Kraitchman DL, Mackay AM, Pittenger MF. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells is inhibited after magnetic labeling with ferumoxides. *Blood* 2004;104(10):3410–3412, author reply 3412–3413
- 20 Jülke H, Veit C, Ribitsch I, Brehm W, Ludewig E, Delling U. Comparative labeling of equine and ovine multipotent stromal cells with superparamagnetic iron oxide particles for magnetic resonance imaging in vitro. *Cell Transplant* 2015;24(06):1111–1125
- 21 Küstermann E, Himmelreich U, Kandal K, et al. Efficient stem cell labeling for MRI studies. *Contrast Media Mol Imaging* 2008;3(01):27–37
- 22 Shinohara RT, Sweeney EM, Goldsmith J, et al; Australian Imaging Biomarkers Lifestyle Flagship Study of Ageing Alzheimer’s Disease Neuroimaging Initiative. Statistical normalization techniques for magnetic resonance imaging. *Neuroimage Clin* 2014;6:9–19
- 23 Simmons A, Tofts PS, Barker GJ, Arridge SR. Sources of intensity nonuniformity in spin echo images at 1.5 T. *Magn Reson Med* 1994;32(01):121–128
- 24 Yoo JH, Park C, Jung D-I, et al. In vivo cell tracking of canine allogenic mesenchymal stem cells administration via renal arterial catheterization and physiopathological effects on the kidney in two healthy dogs. *J Vet Med Sci* 2011;73(02):269–274
- 25 Lu S-S, Liu S, Zu Q-Q, et al. In vivo MR imaging of intraarterially delivered magnetically labeled mesenchymal stem cells in a canine stroke model. *PLoS One* 2013;8(02):e54963

8 ANHANG

8.1 Abkürzungsverzeichnis

ADMs	Mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe
ANOVA	Analysis of Variance
Au	Gold
B-FFE	Balanced Fast Field Echo
CFH	coverage of the femoral head
cm ²	Quadratcentimeter
CR	Computed radiography
CT	Computed tomography
BMDP	Bio-Medical Data Package
DDH	Deutschdrahthaar Hunde
dGEMRIC	Delayed Gadolinium Enhanced Magnetic Resonance Imaging of Cartilage
DICOM	Digital Imaging and Communications in Medicine
DR	Digitale Direktradiographie
DSH	Deutscher Schäferhund
DTPA	Diethylenetriaminpentaessigsäure
ECVDI	European College of Veterinary Diagnostic Imaging
ECVS	European College of Veterinary Surgeons
ED	Ellenbogendysplasie
Et al.	Et alii / et aliae (und andere)
FCI	Federation Cynologique International
Fe	Eisen
FHA	Femoral head area, FHA
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GRSK	Gesellschaft für Röntgendiagnostik genetisch beeinflusster Skeletterkrankungen bei Kleintieren e.V
h	hour (Stunden)
h ²	Heritabilität
HD	Hüftgelenkdysplasie
IBM	International Business Machines Corporation
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
IEWG	International Elbow Working Group
IVS	Intervertebral disc space (Zwischenwirbelspalt)
Kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
L	Lendenwirbel
LR	Labrador Retriever

m	Metastabil
M.	Muskel
MACS	Magnetische Zellseparation
mm	Millimeter
mmol	Millimol
MRT	Magentresonanztomographie
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)
nm	Nanometer
p	probabilitas
PCM	Processus coronoideus medialis
PET	Positronenemmissionstomographie
r	Korrelationskoeffizient
ROI	Region of interest
SAS	Statistical Analysis System
SNR	Signal- zu- Rausch- Verhältnis
SPECT	Single- Photonen- Emissions- Computer Tomographie
SPIO	Superparamagnetic iron oxides
T	Tesla
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TPLO	Tibial Plateau Levelling Osteotomy
TTA	Tibia Tuberosity Advancement
USPIO	Ultrasmall particle iron oxides
WATS	water-selective cartilage scan
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	Technetium-Per technetat
$^{99m}\text{Tc-MDP}$	^{99m}Tc -methylen-diphosphonat
$^{99m}\text{Tc-HMPAO}$	Technetium- 99m (^{99m}Tc)-hexamethyl-propylene-aminoxim
$^{123}\text{I-FP-CIT}$	[^{123}I] <i>N</i> - ω -fluoropropyl-2 β -carbomethoxy-3 β -(4-iodophenyl)nortropane
$^{18}\text{F-FDG}$	2-Fluor-2-desoxy-D-glucose (Fluordesoxyglucose)
3D	Dreidimensional
κ	Kappa
μl	Mikroliter
μ	Mikro

8.2 Danksagung

Zum Abschluss dieser Arbeit möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen beigetragen haben. Da die Momente der Unterstützung unzählbar sind, ist es beinahe unmöglich alle beteiligten Personen namentlich zu erwähnen.

Ein besonders großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. (Bursa, Torun, Stara Zagora) Martin Kramer, der die vorliegende Arbeit ermöglicht und der mich während meiner wissenschaftlichen Karriere unterstützt hat. Er hat mir konstruktive Rückmeldungen gegeben und den nötigen Freiraum gewährt, den eine selbständige wissenschaftliche Weiterentwicklung benötigt. Durch seine Unterstützung konnte ich meine eigenen Ideen und Projekte verfolgen. Vielen Dank für die Zeit, den wiederholten Vertrauensvorschuss und die großartige Hilfe in allen wichtigen Fragen.

Ich danke dem gesamten Team der Abteilung Radiologie der Klinik für Kleintiere (JLU Gießen) für die hervorragende Unterstützung während der gesamten Zeit.

Herzlichen Dank an Dr. Bernd Tellhelm, der mich mit seiner Begeisterung für die bildgebenden Verfahren „angesteckt“ und immer wieder mit fachlicher Expertise, Wertschätzung und Menschlichkeit beeindruckt hat.

Ein großes Dankeschön an Dr. Sebastian Schaub, der während der Abschlussphase meiner Studien ohne zu zögern den klinischen Alltag in Eigenregie koordiniert hat.

An Dr. Nele Eley (geb. Ondreka) herzlichen Dank für die Freundschaft, für den gemeinsamen Weg und für das gemeinsame Wachsen an unterschiedlichsten Herausforderungen.

Ohne die Unterstützung durch Ella Wenz, Gabriele Weber und Holger Wissmann hätten viele der Untersuchungen nicht stattgefunden- ganz herzlichen Dank.

Ich danke allen Doktorandinnen und Doktoranden, die mit mir an Forschungsprojekten gearbeitet haben und nie den Mut verloren haben wenn ein Projekt hohe Anforderungen stellte.

Besonderen Dank an Dr. Christian Feichtenschlager, Dr. Lena Holbein, Dr. Karen John, Dr. Susanne Kaiser, Dr. Malgorzata Kolecka, Dr. Christiane Paulus, Dr. Franziska Schmied, Dr. Jan Wennemuth und Dr. Raffaella Zweifel.

Ich danke allen Beteiligten aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie, und -Embryologie (JLU Gießen), insbesondere Herrn Prof. Dr. Stefan Arnhold und Manuela Heimann für die enorme Unterstützung bei allen Versuchen im Bereich der Stammzellmarkierung. Ausserdem vielen Dank für die Unterstützung an Frau Prof. Dr. Wenisch und Herrn Prof. Dr. Stazyk.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Park (Universität Hamburg), PD Neus Feliu Torres (Fraunhofer IAP) und Sun Xing (Philipps Universität Marburg) herzlichen Dank für die Unterstützung im Bereich der Zellmarkierung mit Hilfe von Nanomaterialien.

Vielen Dank, dass ich mit Ihnen immer „Rechnen“ konnte: Danke an PD Dr. Kathrin Stock, PD Dr. Kathrin Büttner, Marion Sparenberg, Andreas Schaubmar und Dr. Klaus Failing (dem ich leider nicht mehr persönlich danken konnte).

Danke an Prof. Dr. Martin Schmidt, PD Dr. Antje Hartmann und Dr. Friederike Rau für die Begleitung am Beginn der Untersuchungen.

Ein großes Dankeschön an Frau Dr. Nikola Schmidt, die die Arbeit in unzähligen „wirklich allerletzten“ Varianten gelesen und mir immer wieder neuen Mut gegeben hat.

Danke an Alle, die mich auf diesem Weg als Unterstützerinnen, Mentoren und Menschen begleitet haben: Prof. Dr. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel, Prof. Dr. Leopold Brunnberg, Prof. Mathieu Spriet, Sarah Kaluza, Anna Laura Müller und Nicole Scherf.

Meine Arbeit und wissenschaftliche Weiterentwicklung wurde von unterschiedlichen Fördernetzwerken unterstützt. Meine große Verbundenheit gilt dabei der Studienstiftung des Deutschen Volkes, die dabei geholfen hat, die Grundlage für mein wissenschaftliches Arbeiten zu legen.

Mein Forschungsaufenthalt an der University of California in Davis würde durch die Robert Bosch Stiftung ermöglicht. Dieser Aufenthalt hat zum dritten Teil der Arbeit beigetragen.

Der größte Dank gilt meiner Familie:

Meinen Eltern danke ich von Herzen dafür, dass sie das Unmögliche möglich gemacht haben und jede meiner „Ideen“ grenzenlos unterstützt haben.

Herzlichen Dank an Karla und Matthias für die Unterstützung beim Abschluss dieser Arbeit.

Ich danke meinem Ehemann Tassilo und meinen Söhnen für den Rückhalt, die Geduld und Liebe, die nötig waren um aus einem Traum ein realistisches Ziel zu machen. Wir haben auf wertvolle gemeinsame Zeit verzichtet und Ihr habt mir immer wieder neue Energie gegeben.



8.3 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich keine früheren Habilitationsverfahren (weder im Inland noch im Ausland) beantragt habe und versichere, dass ich an keiner anderen Stelle ein Habilitationsgesuch eingereicht habe und vor Abschluss des Verfahrens nicht an anderer Stelle einreichen werde.

Ich erkläre: Ich habe die vorliegende Habilitationsschrift selbstständig und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Arbeit angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht-veröffentlichten Schriften entnommen wurden und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Erstellung der Habilitationsschrift und bei den von mir durchgeführten und in der Arbeit erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ umschrieben sind, eingehalten.

Gießen, 1.12.2023

Dr. Kerstin Heike Gräfin von Pückler von Schwichow