

Aus dem Institut für Klinische Radiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian F. Reiser, FACR, FRCR



Diffusion-Tensor-Imaging des Retropatellaren Gelenkknorpels im Vergleich mit der Anatomie

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Andreas Kellerer
aus
München

2014

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Glaser

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Marcus Schmitt-Sody

Mitbetreuung durch den

Promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. biol. hum. José Maria Raya Garcia del Olmo

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 31.07.2014

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Fragestellung	- 5 -
1.1	Einleitung	- 5 -
1.2	Fragestellung	- 6 -
2.	Aktueller Kenntnisstand in der Literatur	- 8 -
2.1.	Aufbau und Funktion des gesunden hyalinen Gelenkknorpels.....	- 8 -
2.1.1	Allgemeiner Aufbau des hyalinen Gelenkknorpels	- 8 -
2.1.2	Zonale Aufteilung und Verteilung der Kollagenfasern	- 10 -
2.1.3	Zusammensetzung der Matrix und Proteoglykanverteilung.....	- 14 -
2.1.4	Funktion des intakten Knorpels und Biomechanische Grundlagen	- 16 -
2.2	Erscheinung des gesunden, hyalinen Gelenkknorpels in der Histologie bei Anfärbung mit Safranin-O.....	- 17 -
2.3	Erscheinung des gesunden, hyalinen Gelenkknorpels in der Magnetresonanztomographie.....	- 19 -
2.4	Klinik, Diagnostik und Therapie der Arthrose.....	- 20 -
2.5	Veränderungen des hyalinen Gelenkknorpels bei Arthrose	- 22 -
2.6	Theorie der Diffusionsgewichteten Magnetresonanztomographie und des Diffusion-Tensor-Imaging	- 24 -
2.7	Apparent Diffusion-Coefficient.....	- 28 -

2.8	Berechnung und Bedeutung der Eigenvektoren	- 29 -
2.9	Berechnung und Bedeutung der Fractional Anisotropy.....	- 30 -
2.10	Signal-Rausch-Verhältnis	- 31 -
2.11	Diffusions-Tensor-Bildgebung und Anwendung in der klinischen Routine/Forschung	- 31 -
3.	Material und Methoden	- 33 -
3.1	Studiendesign	- 33 -
3.2	Methodik.....	- 36 -
3.2.1	Diffusions-Tensor-Bildgebung	- 37 -
3.2.1.1	Parameter und Einstellungen	- 37 -
3.2.1.2	Verarbeitung und Auswertung der Rohdaten	- 38 -
3.2.2	Histologie – Vorbereitung und Entnahme der Bohrproben	- 39 -
3.2.2.1	Safranin-O-Färbung und Photometrie	- 40 -
3.2.2.2	Bestimmung des Wassergehalts.....	- 43 -
3.2.3	Rasterelektronenmikroskopie	- 44 -
3.3	Aufteilung der Patellae in 2 Gruppen	- 48 -
4.	Statistik	- 51 -
5.	Ergebnisse.....	- 54 -
5.1	Ergebnisse der ADC-Bestimmung im hyalinen Gelenkknorpel	- 54 -
5.1.1	Verhalten der ADC in jungem (Gruppe A) und gealtertem (Gruppe B) Gelenkknorpel.....	- 58 -

5.1.2	Verhalten des Apparent Diffusion Coefficient in Abhängigkeit des Geschlechts.....	- 59 -
5.2	Ergebnisse der Fractional Anisotropy.....	- 61 -
5.2.1	Veränderung der Fractional Anisotropy mit zunehmendem Alter	- 64 -
5.2.2	Unterschiede in der FA in Abhängigkeit des Geschlechts	- 66 -
5.3	Auswertung der Grauwertanalyse.....	- 67 -
5.3.1	GWA in Layer 1 und Layer 2.....	- 69 -
5.3.2	GWA in Gruppe A und Gruppe B	- 72 -
5.3.3	GWA in männlichen und weiblichen Proben.....	- 74 -
5.4	Ergebnisse der Rasterelektronenmikroskopischen Auswertung	- 75 -
5.4.1	Vergleich der REM-Auswertung zwischen männlichen und weiblichen Patellae	- 76 -
5.4.2	Vergleich der REM-Auswertung zw. Gruppe A und Gruppe B	- 77 -
5.5	Auswertung des Wassergehalts	- 81 -
5.6	Korrelation von ADC und GWA.....	- 83 -
6.	Diskussion	- 86 -
6.1	Diskussion des Studiendesigns	- 86 -
6.2	Diskussion der Methoden.....	- 90 -
6.2.1	Diskussion der Diffusions-Tensor-MRT.....	- 90 -
6.2.2	Diskussion der Grauwertanalyse	- 92 -
6.2.3	Diskussion der Rasterelektronenmikroskopie.....	- 94 -

6.2.4	Diskussion der Wassergehaltsbestimmung.....	- 95 -
6.3	Diskussion der Ergebnisse	- 96 -
6.3.1	Diskussion der Ergebnisse der Grauwertanalyse	- 96 -
6.3.2	Diskussion der Ergebnisse der Rasterelektronenmikroskopie	- 97 -
6.3.3	Diskussion der Ergebnisse der Wassergehaltsbestimmung	- 98 -
5.3.4	Diskussion der Ergebnisse der Diffusions-Tensor-Bildgebung	- 98 -
6.3.5	Diskussion der Korrelation von Grauwertanalyse und DTI.....	- 101 -
7.	Ausblick und alternative Messtechniken.....	- 103 -
8.	Zusammenfassung	- 105 -
9.	Literaturverzeichnis	- 108 -
10.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	- 123 -
11.	Abkürzungsverzeichnis	- 128 -
12.	Appendix.....	- 129 -
13.	Danksagung.....	- 132 -

1. Einleitung und Fragestellung

1.1 Einleitung

Hyaliner Knorpel ist eine Sonderform des menschlichen Bindegewebes, die sich aus einer interstitiellen Matrix, Chondrozyten, Wasser und Kollagenfasern zusammensetzt. Er überzieht die miteinander artikulierenden Gelenkflächen und ermöglicht dadurch eine nahezu reibungsfreie, gleitende Bewegung der Gelenke. Zudem verteilt der Knorpel die auf ihn einwirkende Belastung gleichmäßig auf den Knochen und absorbiert somit sowohl Druck- als auch Scher- und Zugkräfte.¹

Diese Fähigkeiten werden durch die strukturelle Zusammensetzung des Knorpels erreicht und können nur von Knorpel in intaktem, unverletztem und degenerativ nicht verändertem Zustand bewältigt werden. Bereits geringe Achsfehlstellungen, altersbedingte Degeneration, Fehlbelastungen, kleinere Verletzungen und Operationen können die Integrität des Gelenkknorpels irreversibel zerstören und führen mittelfristig zum klinischen Bild der Arthrose.

Degenerative Gelenkerkrankungen haben nicht nur für den einzelnen Patienten eine Einschränkung der Mobilität und Lebensqualität zur Folge, sondern stellen demographisch bedingt auch eine stetig zunehmende finanzielle Belastung für das Gesundheitssystem und damit für die Gesellschaft dar, zumal der starke Leidensdruck für den Patienten häufig eine operative Therapieform unumgänglich macht.

Allein in Deutschland werden jährlich über 215.000 Totalendoprothesen-Operationen an Kniegelenken durchgeführt², Berechnungen des Statistischen Bundesamts zufolge wurden im Jahr 2008 insgesamt über 7,6 Milliarden Euro für die Behandlung von Arthrosen aufgewendet.³

¹ Standring S, 2004

² Kurtz SM et al., 2011

³ Gesundheitsberichterstattung des Bundes; Arthrose 2013

Da die Inzidenz der Hüft- und Kniegelenkarthrosen mit zunehmendem Alter ansteigt⁴, wird angesichts der steigenden Lebenserwartung die klinische und sozioökonomische Bedeutung der Arthrose und ihrer Spätfolgen weiter zunehmen.⁵

Um dieser Entwicklung entgegenwirken zu können, müssen Methoden gefunden werden, um die Arthrose möglichst effektiv und kostensparend in ihrem Krankheitsverlauf zu verlangsamen, und sie im Spätstadium zu therapieren. Hierzu sind insbesondere Verfahren zur Erkennung früharthrotischer Veränderungen notwendig, um bereits auf die ersten Anzeichen einer Degeneration reagieren zu können.

In den letzten Jahrzehnten hat sich zu diesem Zweck vor allem die Magnetresonanztomografie hervorgetan, da sie gegenüber anderen Methoden, wie zum Beispiel der Arthroskopie, für den Patienten den Vorteil hat, weder invasiv noch potentiell destruktiv zu sein⁶ und dennoch Aussagen über arthrotische Veränderungen in Gelenken zuzulassen.

1.2 Fragestellung

In den letzten 20 Jahren nahm in der apparativen Diagnostik von Verschleißerscheinungen des Bewegungsapparates und des Gelenkknorpels vor allem die Magnetresonanztomographie (MRT) eine entscheidende Rolle ein. Die Vorteile dieser Methode sind eine hohe Sensitivität und Spezifität, vor allem bei fortgeschrittener Degeneration des hyalinen Knorpels, ohne den Nachteil der Strahlenbelastung durch Röntgenstrahlen. Frühzeitige Veränderungen waren bisher kernspinmorphologisch nur bedingt erkennbar⁷, wären aber von enormer Bedeutung, da in frühen Stadien der Degeneration konservative Maßnahmen noch am wirkungsvollsten sind.⁸ Aus diesem Grund versuchte man neue Messmethoden, wie etwa die Diffusions-Tensor-Bildgebung, zu entwickeln, um diese frühen Verbrauchsprozesse detektieren zu können.⁹ Zur Beurteilung der Sensitivität dieser

⁴ Oliveira et al., 1995

⁵ Stewart WF et al., 2003

⁶ Bashir A et al., 1999

⁷ Burnstein D et al., 2000

⁸ Hunter DJ et al., 2012

⁹ Deng X et al., 2007

neuen Methoden ist ein Abgleich mit den histologisch-anatomischen Veränderungen in degeneriertem Gelenkknorpel notwendig. Hierbei müssen vor allem die Integrität des Kollagenfasergerüsts sowie Gehalt und Verteilung von Proteoglykanen in der Knorpelmatrix beurteilt werden.

Diese Arbeit soll darstellen, wie sich anatomisch bewiesene früharthrotische Veränderungen auf die MRT-Bildgebung auswirken. Hierfür werden anatomischerseits der Verlust des Proteoglykangehalts, der Wassergehalt des Knorpels sowie der Erhalt der Kollagenfaserarchitektur im Rasterelektronenmikroskop begutachtet. Dem gegenüber gestellt werden der anscheinende Diffusionskoeffizient (ADC) und die Fraktionelle Anisotropie (FA), welche sich durch die Diffusions-Tensor-Bildgebung (Diffusion-Tensor-Imaging = DTI) ermitteln lassen.

2. Aktueller Kenntnisstand in der Literatur

2.1. Aufbau und Funktion des gesunden hyalinen Gelenkknorpels

Bevor man sich mit durch Arthrose bedingten Veränderungen der Zusammensetzung und der Integrität von hyalinem Knorpel beschäftigt, muss man sich bewusstwerden, wie ein intakter Gelenkknorpel physiologischer Weise zusammengesetzt ist. Denn nur ein gesunder Knorpel kann die an ihn gestellten Aufgaben zufriedenstellend bewerkstelligen. Dieses Wissen dient als Basis für die Interpretation der Ergebnisse der histologischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen, als auch der durch Diffusions-Tensor-Bildgebung erworbenen Daten.

2.1.1 Allgemeiner Aufbau des hyalinen Gelenkknorpels

Bei hyalinem Gelenkknorpel handelt es sich um eine spezielle Unterform des menschlichen Bindegewebes, welcher die Gelenkflächen von Diarthrosen bedeckt und somit die Oberflächengeometrie in einem Maße verändert, dass ein nahezu reibungsfreies Artikulieren ermöglicht wird.¹⁰ Der reife Knorpel selbst besitzt keinerlei Blut- oder Lymphgefäße, wird aber via Diffusion aus dem perichondrialem Kapillarnetz und aus der Synovialflüssigkeit mit Nährstoffen versorgt.¹¹ Da eine ausreichende Versorgung auf diese Weise nur über eine Strecke von maximal ca. 4 mm gewährleistet werden kann, wird die Dicke des Knorpels somit auf ca. 8 mm limitiert.¹² Ein dickerer Knorpel könnte durch Diffusion nicht mehr ausreichend mit Nährstoffen versorgt werden. Bedingt durch die geringe Dicke des Knorpels, bietet er nur einen geringen Widerstand gegenüber Druckbelastung und Stößen. Scher- und Zugkräfte werden in einem weitaus höheren Maß abgepuffert.¹³

¹⁰ Standring S, 2004

¹¹ Gray's Anatomy, 39th Edition

¹² Benninghoff A, 2008

¹³ Kummer B, 2008

Der Diffusionskoeffizient für kleine Moleküle ist in humanem Knorpelgewebe etwa halb so hoch als in Wasser. Mit zunehmender Molekülgröße nimmt der Diffusionskoeffizient stetig ab.¹⁴

Schneidet man Gelenkknorpel in dünne Scheiben, erscheinen diese Scheiben milchglasartig-bläulich, deshalb wird er auch als hyaliner (griechisch: hyalos = gläsern) Knorpel bezeichnet.¹⁵

Der Aufbau des hyalinen Knorpels gestaltet sich in etwa wie folgt: Knorpel setzt sich aus Chondrozyten und ihren unreifen Vorläuferzellen (Chondroblasten) sowie einer Interzellulärsubstanz mit geformter und ungeformter Matrix zusammen. Mehr als die Hälfte (etwa 60 bis 70%) des Gesamtgewichts der Knorpelmatrix fallen auf freies und gebundenes Wasser zurück.¹⁶ Der Anteil der Kollagenfasern liegt bei knapp 50% des Trockengewichts (in etwa 16% d. Gesamtgewichts). Der Rest der Knorpelmatrix wird gebildet von GAG (= Glykosaminoglykanen), Mineralien und Albumin.

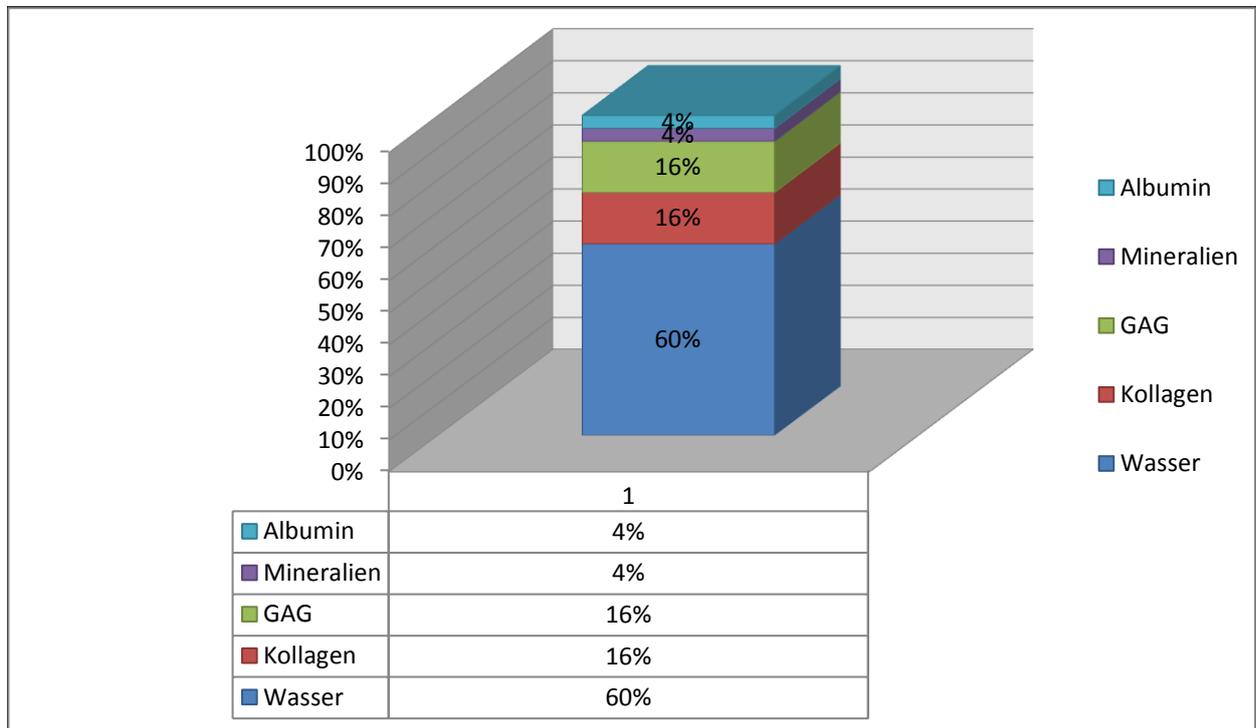


Abbildung 1: Zusammensetzung der Knorpelmatrix

¹⁴ Standring S, 2004; Benninghoff A, 2008

¹⁵ Schiebler TH et al., 2007

¹⁶ Kummer B, 2005; Benninghoff A, 2008

Chondrozyten stammen ab von undifferenzierten Mesenchymzellen und liegen innerhalb des Knorpels immer in Nestern von zwei bis zehn Zellen vor, welche durch mitotische Teilung aus einer Knorpelzelle entstanden sind und deshalb als isogene Gruppe bezeichnet werden.¹⁷ Im erwachsenen Knorpel nehmen sie in der Regel weniger als 5% des gesamten Gewebevolument ein.¹⁸ Sie sind dafür verantwortlich, die Matrixkomponenten zu bilden und deren Abbau zu steuern. Chondrozyten haben somit sowohl sekretorische als auch resorptive Aufgaben. Diese Vorgänge werden unter anderem durch den Transkriptionsfaktor Sox 9 gesteuert.¹⁹

Die Aktivität der Knorpelzellen wird unter anderem durch Hormone beeinflusst: Thyroxin und Testosteron wirken hierbei steigernd, Östradiol und Kortison hingegen hemmend auf den Zellmetabolismus.²⁰ In gesundem, reifem Gelenkknorpel liegen die Chondrozyten jedoch für Jahrzehnte in einem inaktiven Zustand vor, es findet keinerlei Metabolismus oder Mitotische Teilung statt.²¹ Erst bei arthrotischem Umbau kommt es bedingt durch inflammatorische Cytokine zu einer Reaktivierung der metabolischen Aktivität der Chondrozyten.²²

2.1.2 Zonale Aufteilung und Verteilung der Kollagenfasern

Wie Benninghoff schon 1925 feststellte, gibt es einen arkadenartigen Aufbau der Kollagenfasern im hyalinen Gelenkknorpel.²³ An der Knorpel-Knochen-Grenze verlaufen die Kollagenfasern radiär, um dann in einem Bogen eine parallel zur Knorpeloberfläche angeordnete Ausrichtung einzunehmen. In Abhängigkeit dieses Faserverlaufs geschieht die Einteilung des hyalinen Gelenkknorpels in insgesamt 4 Zonen. Die prozentuale Dicke dieser Zonen ist von Art und Lokalisation des Knorpels abhängig, und kann sich durchaus unterscheiden. Die hier erwähnten Statistiken betreffen jeweils den retropatellaren Knorpel, der im Rahmen dieser

¹⁷ Aumüller G, 2006; Kummer B, 2005

¹⁸ Pullig O et al., 2001

¹⁹ Orfanidou T et al., 2009

²⁰ Schiebler TH et al., 2007

²¹ Tallheden T et al., 2006; Aigner T et al., 2001

²² Goldring MB et al., 2008

²³ Benninghoff A, 1925

Dissertation untersucht wird, Abweichungen in Knorpel anderer Lokalisation können auftreten:

1. Tangentialzone: Die den Knorpel nach außen abgrenzende Zone wird Tangentialzone genannt. Sie ist meist nur wenige 100 µm dick und bildet die dünnste Zone im Aufbau des Knorpels mit dem höchsten Kollagengehalt.²⁴ In ihr verlaufen parallel zur Knorpeloberfläche sehr eng gepackte, dünne Kollagenfasern mit einem Durchmesser von ca. 4 bis 6 nm.²⁵ Die Tangentialzone enthält nur wenige Chondrozyten, welche meist einzeln vorliegen und von flacher bzw. spindelförmiger Beschaffenheit sind.²⁶ Durch die Anordnung der Fasern bewirkt sie eine Verteilung der Druckbelastung in die Breite der darunter folgenden Schichten. Die Begrenzung nach oben bildet die sogenannte Lamina splendens, eine ca. 3 µm dünne, zellfreie Schicht aus eng gepacktem, waagrecht zur Oberfläche verlaufendem Kollagen und Protein.²⁷
2. Transitionalzone: Unterhalb der Tangentialzone folgt die Transitionalzone mit locker gepackter, ungeordnet verlaufender Anordnung der Kollagenfasern. Dadurch bietet sie einen Widerstand gegen auftretende Scherkräfte. In der histologischen und elektronenmikroskopischen Aufarbeitung kann man Aussparungen erkennen, in denen sich Chondrozytenester mit spheroiden Chondrozyten²⁸ befinden. Die Zone nimmt in etwa 20-70% des gesamten Knorpeldurchmessers ein.²⁹ Während der Kollagengehalt im Vergleich zur Tangentialzone sinkt, nimmt der Proteoglykangehalt zu.³⁰ Die sich kreuzenden Kollagenfasern besitzen einen durchschnittlichen Durchmesser von etwa 70 bis 120 nm.³¹

²⁴ Muir H et al., 1970

²⁵ Standring S, 2004

²⁶ Brighton CT et al., 1984; Poole CA et al., 1997

²⁷ Buckwalter JA et al., 1998; Standring S, 2004

²⁸ Poole CA et al., 1997

²⁹ Broom ND et al., 1985; Pearle D et al., 2005

³⁰ Muir et al., 1970; Poole CA et al., 1997

³¹ Muir H et al., 1970

3. Radiärzone: Die dickste Schicht des menschlichen Knorpels bildet die Radiärzone, die zwischen 30 und 60% des gesamten Knorpelvolumens einnimmt.³² In ihr verlaufen die Kollagenfasern senkrecht zur Knorpel-Knochen-Grenze und geben somit die Druckbelastung direkt an die darunterliegende Schicht (Tide Mark) weiter. Die Fasern sind hier besonders dick (>100 nm) und gehen in der Tiefe direkt in das verknöcherte Tide Mark über. Der Proteoglykangehalt ist in dieser Schicht am höchsten.³³
4. Tide Mark: Der Übergansbereich des Knorpels in den Knochen. Es besitzt eine unregelmäßige, in der Horizontalen wellige Struktur, welche es ermöglicht, die auftretenden Scherkräfte in Zug- und Druckbelastung umzuwandeln, welche anschließend vom subchondralen Knochen absorbiert werden.

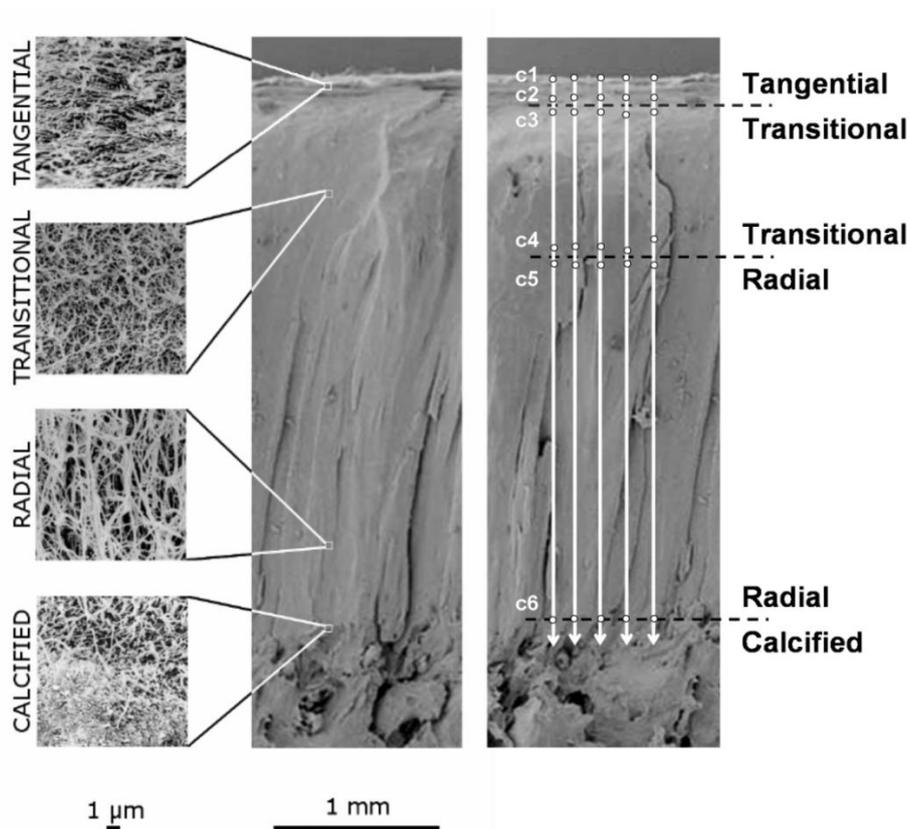


Abbildung 2: Zonale Gliederung des hyalinen Gelenkknorpels. Rasterelektronenmikroskop (übernommen aus Raya et al. MAGMA 2011 24(4):247-258.)

³² Pearle D et al., 2005; Igbal K et al., 2012

³³ Poole CA et al, 1997

Kollagen macht etwa 50% des Trockengewichts von hyalinem Knorpel aus.³⁴ Bis zu 90% des in hyalinem Knorpel verbauten Kollagens besteht aus 15 bis 45 nm³⁵ dickem Kollagen Typ II³⁶, welches sich aus drei identischen $\alpha_1(\text{II})$ -Ketten zusammensetzt: $[\alpha_1(\text{II})]_3$.³⁷ Des Weiteren findet sich Kollagen-Typ VI, IX, X, XI und in geringem Maße auch I, III, V und XIV.³⁸ Typ I-Kollagen liegt hauptsächlich perizellulär vor. Die Kollagenfasern verzweigen sich nicht. Bedingt durch den arkadenartigen Aufbau des Kollagenfasergeflechts ergibt sich ein fließender Übergang der Zonen ineinander.³⁹

Circa 5% der Kollagenfasern weichen von der zonalen Hauptrichtung der Kollagenfaserverläufe ab.⁴⁰

Zusammenfassend nimmt der Anteil an Kollagen von der Knorpeloberfläche zur Knorpel-Knochen-Grenze hin stetig ab, wohingegen die Proteoglykankonzentration und damit einhergehend der Wassergehalt in der Tiefe zunehmen.⁴¹

³⁴ Standring S, 2004

³⁵ Standring S, 2004; Welsch U, 2005

³⁶ Buckwalter JA, Mankin HJ, 1998

³⁷ Kummer B, 2005

³⁸ Schiebler TH et al., 2007

³⁹ Aumüller G, 2006

⁴⁰ Hedlund et al., 1993

⁴¹ Grushko G et al., 1989

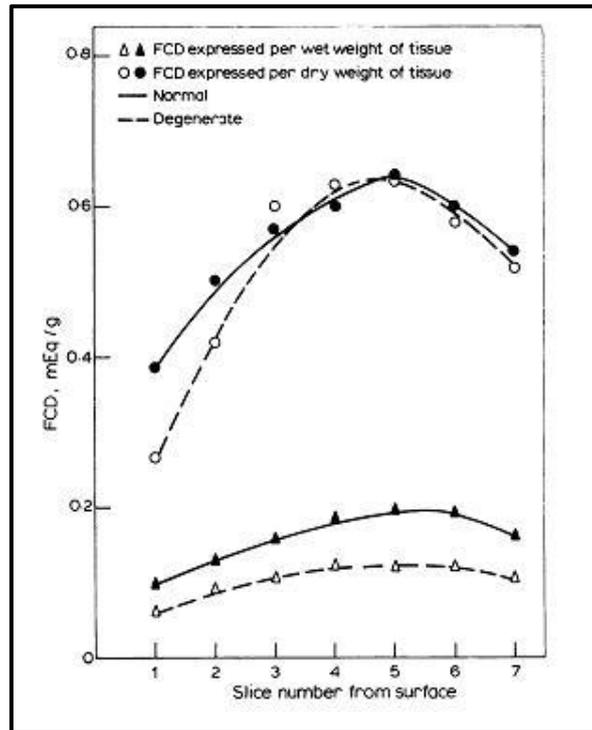


Abbildung 3: Verteilung des Proteoglykangehalts (übernommen von Maroudas A et al. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 1977, 36, S.399-406)

2.1.3 Zusammensetzung der Matrix und Proteoglykanverteilung

Die Matrix des hyalinen Gelenkknorpels besteht zu einem Großteil aus Wasser und Kollagenfasern, welche als geformter Teil der extrazellulären Matrix bezeichnet werden. Der ungeformte Anteil der Matrix wird während der Wachstumsphase von den Chondrozyten gebildet. Diese mauern sich somit selbst in ihrer eigenen Matrix ein.

Die ungeformte Matrix ist besonders reich an Proteoglykanen. Diese bestehen aus einem zentralen Core-Protein, an welches Hunderte von Glykosaminoglykan-Seitenketten gebunden sind.⁴² Diese Proteoglykankomplexe binden wiederum an das, ebenso in großer Menge auftretende, Hyaluronan (=Hyaluronsäure), einem nicht-sulfatierten Glykosaminoglykan (=GAG).

⁴² Kummer B, 2006

Proteoglykane und Hyaluronsäure liegen in der Matrix als große Aggregate vor, die eine Länge von bis zu 2-3 μm besitzen können. Verbunden werden die beiden Bestandteile durch Link-Proteine und Hyalonectin.⁴³

Das meistverbaute Proteoglykan ist hier das Aggrecan (vor allem zusammengesetzt aus Chondroitin-4-Sulfat-, Chondroitin-6-Sulfat- und Keratansulfat-Seitenketten⁴⁴), welches durch seinen hohen Gehalt an negativ-geladenen Anionen die Basophilie der Matrix verursacht. Negative Ladungen bewirken eine hohe Bindung von Natriumionen, sodass im Vergleich zur Synovialflüssigkeit die Natriumkonzentration im Knorpel etwa dreifach erhöht ist. Dies wiederum hat die hohe Wasserbindungskapazität des Gelenkknorpels zur Folge. Die in menschlichem Knorpel am häufigsten vorkommenden Elektrolyte sind neben Natrium noch Chlorid, Kalium und Calcium.

⁴³ Aumüller G, 2006

⁴⁴ Aumüller G, 2006; Welsch U, 2005

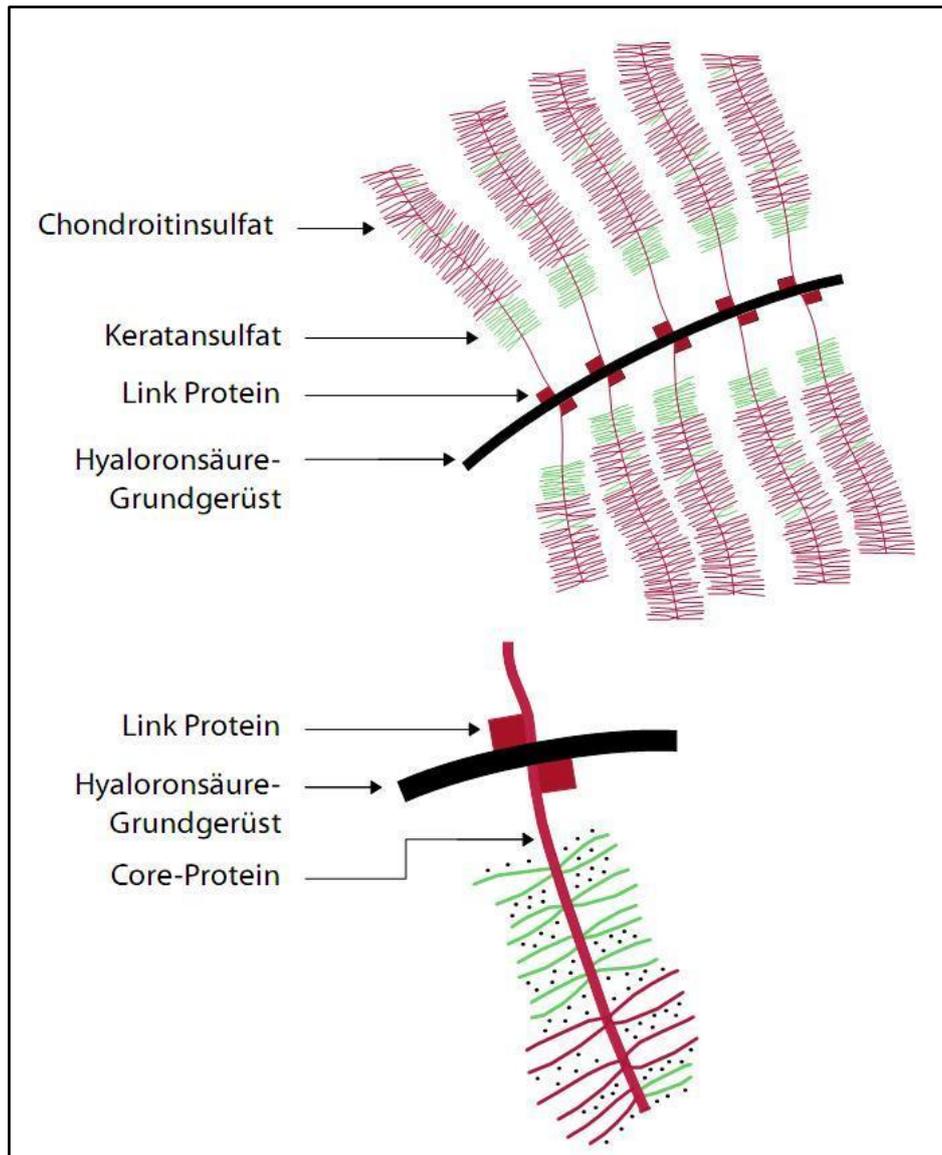


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Zusammensetzung der ungeformten Knorpelmatrix

Durch diese Beschaffenheit ermöglicht es die extrazelluläre Matrix, den Knorpel mit Gasen, Nährstoffen und Metaboliten zu versorgen, und Abbauprodukte des Stoffwechsels abzutransportieren.

2.1.4 Funktion des intakten Knorpels und Biomechanische Grundlagen

An den hyalinen Gelenkknorpel werden in erster Linie folgende zwei Anforderungen gestellt: Zum einen bewirkt die glatte Oberfläche, in Verbindung mit der sie

benetzenden Synovialflüssigkeit, eine Reduktion der Reibung. Dies hat im gesunden Gelenk einen bestmöglichen Schutz vor Abnutzungserscheinungen zur Folge. Der Friktionskoeffizient (Friktion = bei Bewegung entstehende Reibung) beträgt bei intaktem Knorpel nur etwa ein Fünftel des Wertes zweier aufeinander rutschender Eisplatten, was wesentlich geringer ist als der Koeffizient bei künstlichen Gelenkersatzmethoden.⁴⁵

Zum anderen bewirkt der Knorpel durch seine leichte Verformbarkeit eine verbesserte Verteilung der Druckkräfte auf den Knochen. Diese Verformbarkeit wird erreicht durch die sakkadenartige Anordnung der Kollagenfasern und die Eigenschaften der interstitiellen Matrix. Somit wird nicht nur das Körpergewicht auf ideale Weise verteilt, sondern es werden auch in geringem Maße Stöße und Erschütterungen ab gepolstert.

Durch ständige, intermittierende Deformation, wie sie bei leichter Belastung auftritt, wird der hydrostatische Druck aufrechterhalten.⁴⁶ Nur unter diesen Voraussetzungen kann der intakte Gelenkknorpel seinen Aufgaben gerecht werden.

Generell handelt es sich beim hyalinen Gelenkknorpel um ein stark deformierbares Stützgewebe, welches ein niedriges Elastizitätsmodul besitzt.⁴⁷

2.2 Erscheinung des gesunden, hyalinen Gelenkknorpels in der Histologie bei Anfärbung mit Safranin-O

Bereits 1971 stellten Mankin et al. fest, dass die degenerativen Veränderungen bei Arthrose mit einem Verlust des Gehalts an Glykosaminoglykanen einhergehen.⁴⁸ Glykosaminoglykane liegen im hyalinen Gelenkknorpel vor allem gebunden an ein Core Protein vor. Die somit entstehenden Aggregate werden Proteoglykane genannt und spielen eine zentrale Rolle im Aufbau der Knorpelmatrix. Ein Farbstoff, der selektiv an Proteoglykane bindet und einen möglichen Verlust an Glykosaminoglykanen bei arthrotischen Umbauprozessen anzeigt, hat somit das Potential, Hinweise auf degenerative Veränderungen des Knorpels darzustellen.

⁴⁵ Mankin HJ, 1994

⁴⁶ Kummer B, 2005

⁴⁷ Kummer B, 2005

⁴⁸ Mankin HJ et al., 1971

1971 legten Rosenberg et al. die Voraussetzungen fest, welche an einen Farbstoff, der selektiv die Proteoglykane des hyalinen Gelenkknorpels anfärbt, gestellt werden: Der Farbstoff darf dabei nicht an Kollagen binden, seine extrazelluläre Verteilung soll der Verteilung der Glykosaminoglykane entsprechen.⁴⁹

In Safranin-O fand man einen kationischen Farbstoff, welcher orthochromatisch an die Polyanionen der Glykosaminoglykane bindet, ohne eine Bindung zum Kollagen einzugehen. Dies wurde unter anderem durch Jubb und Eggert bestätigt.⁵⁰ Mit seinem stöchiometrischen Bindungsverhalten an die Polyanionen der GAG⁵¹ bietet Safranin-O somit die perfekten Voraussetzungen für eine semiquantitative Bestimmung des Proteoglykangehalts des hyalinen Gelenkknorpels.⁵²

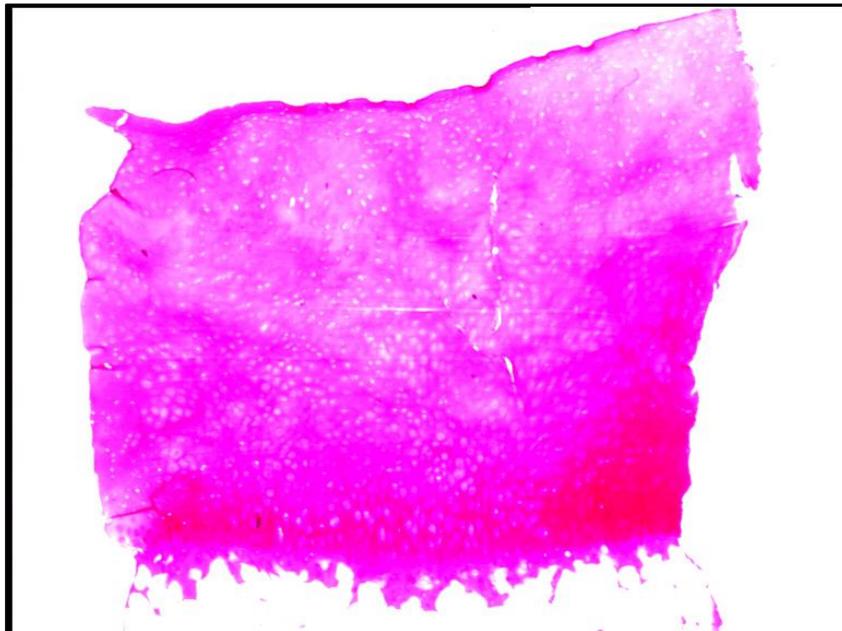


Abbildung 5: Safranin-O-Färbung; Patella 22

Gemäß der Proteoglykanverteilung färbt sich der hyaline Knorpel mit Safranin-O folgendermaßen an: Aufgrund der eng gepackten Kollagenfasern und des geringen Anteils an Proteoglykanen kommt es in der Tangentialzone nur zu einer geringen Anfärbung. In der Transitionalzone steigt der Gehalt an Proteoglykanen, das Anfärbeverhalten nimmt leicht zu. Der Großteil der Proteoglykane konzentriert sich

⁴⁹ Rosenberg L et al., 1971

⁵⁰ Jubb RW et al., 1981

⁵¹ Kiviranta I et al., 1985

⁵² Kiraly K et al., 1996; Trattinig S et al., 2001

auf die Radiärzone, sodass sich hier die stärkste Anfärbbarkeit findet.⁵³ Das Tide Mark zeigt keinerlei Annahme des Farbstoffes.

2.3 Erscheinung des gesunden, hyalinen Gelenkknorpels in der Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie hat sich in den letzten Jahrzehnten als aussagekräftiges Werkzeug in der klinischen Diagnostik sowie in der klinisch-radiologischen Forschung erwiesen. Ohne Strahlenbelastung liefert die MRT einen hervorragenden Weichteilkontrast und erlaubt somit hochsensitive und -spezifische Aussagen auch über die Integrität des hyalinen Gelenkknorpels. Dadurch war die Magnetresonanztomographie von Beginn an prädestiniert für die Bildgebung des Bewegungsapparates. Vor allem bei der Untersuchung von Bandscheibenvorfällen, Meniskusleiden des Kniegelenks und der Früherkennung bei Schlaganfällen ist die MRT aus der klinischen Routine nicht mehr wegzudenken.

Bereits früh in der Entwicklung der MRT ließ sich eine laminäre Strukturierung innerhalb des hyalinen Gelenkknorpels darstellen.⁵⁴ Obwohl die Ursache dieser Struktur nicht sicher geklärt war, lag der Verdacht seit jeher nahe, dass hier eine Verbindung mit der zonalen Aufteilung, welche bereits aus Histologie und Rasterelektronenmikroskopie bekannt war, bestand. Eine durch die unterschiedliche Verteilung und Orientierung der Kollagenfasern beeinflusste Ausrichtung der Wassermoleküle wurde als Grundlage der oben genannten Erscheinung vermutet.⁵⁵

Im gesunden artikulären Knorpel nehmen die T2-Relaxationszeiten von der Knorpeloberfläche bis ins Tide Mark stetig ab. Als Ursache hierfür sieht man am ehesten die Zunahme der Makromoleküle in der Tiefe.⁵⁶ Die erhöhte Anzahl an Proteoglykanen und Kollagen behindert in den tieferen Schichten die Mobilität der Wassermoleküle und führt somit zu einem Verlust an Signalintensität in der T2-Wichtung.⁵⁷

⁵³ Uhl M et al., 1998

⁵⁴ Lehner KB et al., 1989

⁵⁵ Rubenstein JD et al., 1993; Xia et al., 1997; Fragonas et al., 1998

⁵⁶ Dadzinski BJ et al., 1997

⁵⁷ Watrin A et al., 2001

Da durch die degenerativen Prozesse bei Arthrose die freie Beweglichkeit der Wassermoleküle im Knorpel zunimmt, erscheint die Diffusions-Tensor-Bildgebung als gute Methode, die Integrität der Kollagenfaserarchitektur zu untersuchen. Hierfür gab es etliche Studien, jedoch mit sehr unterschiedlichen Settings und an unterschiedlichen MR-Scannern mit einer variierenden Feldstärke von 1,5 bis 17,6 Tesla. Der bereits erwähnte Zusammenhang des bekannten zonalen Aufbaus mit den Resultaten der MR-Messungen konnte durch DTI bestätigt werden.⁵⁸

2.4 Klinik, Diagnostik und Therapie der Arthrose

Arthrose ist eine, in der Gesellschaft weit verbreitete degenerative Gelenkerkrankung, welche mitunter gravierende sozioökonomische Auswirkungen hat. Die Erkrankung geht einher mit einem fortschreitenden Verlust des hyalinen Gelenkknorpels, Sklerosierung des subchondralen Knochens und einer Entzündungsreaktion der Gelenkkapsel. Bei der idiopathischen Arthrose handelt es sich in der Regel um einen langjährigen Prozess. Es kommt häufig bereits zu initialen Veränderungen, Jahre bevor klinische Beschwerden auftreten.⁵⁹ Im Endstadium treten bei den betroffenen Patienten Schmerzen, Immobilisation, Kontrakturen, Einsteifung des Gelenkes und vollständiger Funktionsverlust auf.

Derzeit wird die Diagnose "Arthrose" in Abhängigkeit von zwei Faktoren erstellt: Primär muss eine klare Symptomatik vorliegen, wie zum Beispiel bewegungsabhängige Schmerzen. Infolgedessen wird in der Regel ein Standardröntgenbild des betroffenen Gelenks angefertigt, meist in mindestens zwei Ebenen. Folgende röntgenmorphologischen Ergebnisse erhärten die Verdachtsdiagnose: Verschmälerung des Gelenkspaltes, subchondrale Sklerosierung (Verdichtung der Spongiosa), Entstehung von Geröllzysten, Bildung von Osteophyten.⁶⁰ Bereits 1966 konnte gezeigt werden, dass über 80% der Bevölkerung ab dem 55. Lebensjahr in mindestens einem Gelenk diese röntgenologischen Zeichen einer Arthrose aufweisen.⁶¹ Eine durch konventionelle

⁵⁸ Raya JG et al., 2011; de Visser SK et al., 2007

⁵⁹ Byers PD et al., 1970

⁶⁰ Aumüller G et al., 2006

⁶¹ Lawrence JS et al., 1966

Röntgen-Technik nachweisbare Kniegelenkarthrose findet sich in 16,3 % der 55- bis 63-jährigen, in der Gruppe der über 75-jährigen sogar in 32,8%.⁶²

Der Großteil der Erkrankten leidet an einer idiopathischen Arthrose. Zu den Risikofaktoren hierzu gehören fortgeschrittenes Alter, das weibliche Geschlecht, mechanische Überbeanspruchung und in zunehmendem Maße das Übergewicht.⁶³

Vor allem bei der Entstehung der Cox- und Gonarthrose spielt die kontinuierliche Belastung durch ein hohes Körpergewicht eine bedeutende Rolle. Bei einem Body Mass Index über 30 kg/m² ist das Risiko, im Laufe eines Lebens an Arthrose zu erkranken, bereits über 60%.⁶⁴

Bis heute gibt es keine zufriedenstellende Therapie der Arthrose. Im Frühstadium beschränkt man sich weitestgehend auf konservative Maßnahmen, wie Patientenschulungen, Anleitungen zur Gewichtsreduktion, krankengymnastische Übungen zur Stärkung der Muskulatur, Kälte- und Wärmeanwendungen (zum Beispiel Fango) oder Schmerzreduktion durch TENS-Geräte. Hinzu kommt zur Schmerzbekämpfung vor allem der Einsatz von Paracetamol und nichtsteroidalen Antirheumatika, oder, bei stärker ausgeprägtem Schmerzcharakter, von Opioid-Analoga. Erst in weit fortgeschrittenen Stadien wird eine operative Behandlung empfohlen, die in der Regel einen teilweisen oder vollständigen Ersatz der Gelenkfläche verlangt.⁶⁵

In den letzten Jahren wurden Hyaluronsäurepräparate entwickelt, welche vor allem im Frühstadium durch intraartikuläre Injektion eine Schmerzlinderung bewirken können.⁶⁶ Trotz Verbesserung der subjektiven Schmerzbelastung⁶⁷ werden diese Medikamente nicht in breitem Umfang eingesetzt, was unter anderem auch an einer fehlenden Kostenübernahme durch die Krankenkassen liegt.

⁶² Jordan JM et al., 2007

⁶³ Arden N et al., 2006

⁶⁴ Murphy L et al., 2008

⁶⁵ Conaghan PG et al., 2008; Zhang W et al., 2008

⁶⁶ McArthur B et al., 2012

⁶⁷ Leeb BF et al., 2007

2.5 Veränderungen des hyalinen Gelenkknorpels bei Arthrose

Die degenerativen Veränderungen bei arthrotischem Umbau beginnen auf mikroskopischer Ebene bereits Jahre vor dem Auftreten subjektiver Beschwerden des Patienten⁶⁸ und vor Auftreten von im konventionellen Röntgenbild sichtbaren Veränderungen. In diesem Stadium ist der entstandene Schaden bereits weitgehend irreversibel.

Initial kommt es zu einer Abnahme der Proteoglykankonzentration im oberflächlichen Knorpel, später setzt sich dieser Proteoglykanverlust auch in die tieferen Regionen fort.⁶⁹ Die Zerstörung des GAG-Netzes hat eine Umverteilung des osmotischen Druckes zur Folge⁷⁰, der Knorpel kann dem Binnendruck nicht mehr standhalten und beginnt zu quellen. Gleichzeitig kommt es zu einer Vermehrung der Kollagenfasern, wodurch diese unmaskiert werden, und somit zu einer Auffaserung des Kollagens. Es bilden sich sogenannte Asbestfasern⁷¹, welche über 1 µm dick sein können.⁷² Die elektrische Ladung innerhalb der Matrix verändert sich, wodurch die metabolische Aktivität der Chondrozyten wieder angeregt wird. In den letzten Jahren zeigte sich, dass vor allem Cytokine und inflammatorische Mediatoren eine bedeutende Rolle in der Genese der Arthrose spielen. Die Ausschüttung dieser veranlasst die Chondrozyten Stickstoffmonoxid (NO) und Metalloproteinasen zu bilden.⁷³ Dies hat wiederum zur Folge, dass die Produktion der Proteoglykane abnimmt und es zu einer Apoptose der Chondrozyten kommt.⁷⁴ Die Zelldichte von Chondrozyten im menschlichen Hüftgelenk nimmt zum Beispiel vom 16. bis zum 100. Lebensjahr um ca. 40% ab.⁷⁵

Anscheinend spielen auch freie Radikale und AGEs (advanced glycation end-products) eine gewisse Rolle bei der Entstehung arthrotischer Degeneration.⁷⁶

⁶⁸ Byers PD et al., 1970

⁶⁹ Buckwalter JA et al., 1994; Schiebler TH et al., 2007

⁷⁰ Maroudas A., 1976

⁷¹ Kummer B., 2005

⁷² Benninghoff A., 2008; Schiebler TH et al., 2007

⁷³ Goldring MB et al., 2008

⁷⁴ Hancock CM et al., 2008

⁷⁵ Vignon E et al., 1976

⁷⁶ Loeser RF et al., 2010; Henrotin YE et al., 2003

Des Weiteren nimmt mit zunehmender Degeneration des Knorpels der Wassergehalt und damit auch die Druckelastizität ab.⁷⁷

Buckwalter und Mankin fassten die oben beschriebenen, degenerativen Vorgänge zusammen und teilten sie in drei Stadien der Arthrose ein:

Stadium I: Eine sichtbare Fibrillation der Gelenkoberfläche geht einher mit der Zunahme des intrakartilaginären Wassergehaltes. Bereits in diesem frühen Stadium tritt eine irreversible Schädigung des Knorpels ein.

Stadium II: Katabole und anabole Vorgänge finden nebeneinander statt, es kommt zu multiplen Umbauvorgängen und einer Änderung in der Zusammensetzung der Matrix. Die gesteigerte Syntheseleistung der Chondrozyten bezeichnet man auch als „Repair Effect“.⁷⁸

Stadium III: Es kommt zu einem Verlust an Knorpelsubstanz⁷⁹ und zu Veränderungen des subchondralen Knochens (Osteophyten, subchondrale Sklerose, Knochenzysten), die klassischen Zeichen einer klinisch weit fortgeschrittenen Arthrose treten auf.⁸⁰

Da der hyaline Gelenkknorpel keinerlei nervale Versorgung besitzt, treten klinische Symptome, wie bewegungsabhängige Schmerzen, erst auf, wenn bereits andere Bereiche des Gelenks geschädigt sind.

⁷⁷ Maroudas A et al., 1980; Schiebler TH et al., 2007

⁷⁸ Mankin HJ, 1974

⁷⁹ Ding C et al., 2005

⁸⁰ Buckwalter JA, Mankin HJ, 1998

2.6 Theorie der Diffusionsgewichteten Magnetresonanztomographie und des Diffusion-Tensor-Imaging

Als technische Grundlage der Diffusions-Tensor-Bildgebung dient das diffusionsgewichtete MRT, wie es seit den 80er Jahren in der klinischen Forschung und auch der Routinebildgebung Verwendung findet. Diese Methode basiert auf einer Spin-Echo-Technik, der bereits 1965 vorgestellten Stejskal-Tanner-Sequenz⁸¹: Der erste Diffusionsgradient bewirkt eine Dephasierung der Spins. Sollten diese ihre Position nicht ändern, würden sie nach dem 2. Diffusionsgradienten wieder in Phase präzedieren. Durch Diffusion der Wassermoleküle kommt es jedoch zu einer räumlichen Verschiebung mancher Spins in Richtung des Magnetfelds, was zu einem Verlust an Phasenkohärenz und somit zu einer Abschwächung des akquirierten Signals führt. Diese Abschwächung (S) des Signals nimmt mit ansteigender Beweglichkeit von freien Wassermolekülen zu.

Die Messung der Diffusion in Gewebe basiert auf der Annahme von Robert Brown aus dem Jahre 1827 über die Brown'sche Molekularbewegung.⁸² Die Bewegungen der freien Wassermoleküle entlang des Diffusionsgradienten ermöglicht es uns hierbei, Rückschlüsse auf mikroskopische Strukturen von Geweben treffen zu können.

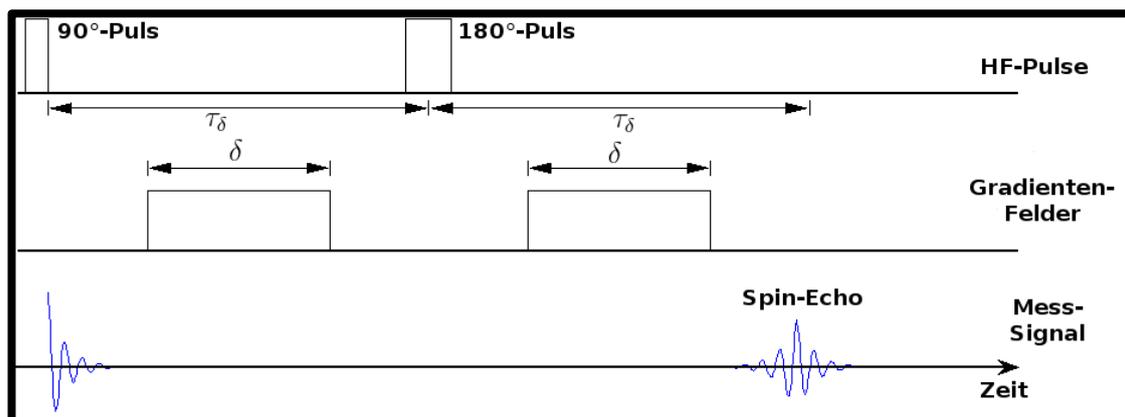


Abbildung 6: Stejskal-Tanner-Sequenz

⁸¹ Stejskal EO, Tanner JE, 1965

⁸² Brown R, 1828

Bei der herkömmlichen diffusionsgewichteten Bildgebung wird die Diffusion entlang einer einzigen Richtung gemessen. Diese ist hierbei abhängig von der Richtung des Diffusionsgradienten. Der Anteil der Diffusionswichtung wird durch den b-Wert beschrieben. In der klassischen diffusionsgewichteten MRT wird der b-Wert als ein Skalar dargestellt.

Der Diffusionskoeffizient (D) beschreibt, inwieweit sich ungebundene Wassermoleküle frei in Gewebe bewegen können.

Formel [1] zeigt, wie sich die Abschwächung des akquirierten Signals in Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten und des b-Werts errechnen lässt.⁸³

$$S(b) = S(0) \times e^{-bD} \quad [1]$$

Formel 1: Stejskal-Tanner-Gleichung

Der b-Wert lässt sich in Abhängigkeit von der Amplitude und Dauer des Diffusionsgradienten sowie dem zeitlichen Abstand der beiden Gradienten wie folgt errechnen⁸⁴:

$$b = (\gamma \times g \times \delta)^2 \times \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right) \quad [2]$$

Formel 2: Berechnung des b-Werts

Der Grad der Diffusionswichtung nimmt demnach mit zunehmender Amplitude (g) und Dauer des Diffusionsgradienten (δ) sowie zunehmendem Zeitintervall (Δ) zwischen den Gradientenfeldern zu. Ebenso spielt das gyromagnetische Verhältnis (γ) eine wichtige Rolle in der Berechnung des b-Werts (siehe Formel 2).

Zur Quantifizierung der durch Diffusion akquirierten Signale bedienen wir uns des Diffusionskoeffizienten D, welcher sich durch die gemessene Signaldämpfung S

⁸³ Stejskal EO, Tanner JE, 1965

⁸⁴ LeBihan D et al., 1991

errechnen lässt (s. Formel 3). Hierfür ist es notwendig, mindestens zwei separate Messungen mit unterschiedlichen b-Werten durchzuführen.

Der Diffusionskoeffizient lässt sich nun mit folgender Formel errechnen:

$$D = \frac{\log(S_{b_1}) - \log(S_{b_2})}{b_2 - b_1} \quad [3]$$

Formel 3: Berechnung des Diffusionskoeffizienten

b = b-Wert [s/mm²]

D = Diffusionskoeffizient

g = Amplitude des Diffusionsgradienten

γ = gyromagnetisches Verhältnis

δ = Dauer des Gradientenfeldes

Δ = Zeitspanne zwischen dem Anschalten des ersten und des zweiten Gradientenfelds

S = Signal

Aufgrund der komplexen Struktur menschlichen Gewebes, ergibt die Diffusion in Abhängigkeit von der ausgewählten Diffusionsrichtung unterschiedliche Diffusionswerte. Deshalb benötigen wir zur Beschreibung der Diffusion in humanem Knorpel ein weitaus komplexeres Modell. Hierbei kann man sich des Diffusionstensors bedienen, welcher es ermöglicht, die Diffusion von Wassermolekülen innerhalb eines symmetrischen Tensors darzustellen. Die Errechnung der einzelnen Komponenten des Diffusionstensors erfolgt mit Hilfe von verschiedenen Diffusionsmessungen.

Mathematisch gesehen ist ein Tensor die Bezeichnung für ein mathematisches Produkt. Tensoren der Stufe 1 stellen Spaltenvektoren dar. Bei der Diffusionstensor-Bildgebung finden Tensoren der Stufe 2 Verwendung, welche eine quadratische Matrix mit $3^2=9$ Koeffizienten besitzen (s. Abbildung 7). Da der Diffusionstensor jedoch symmetrisch ist, sind in diesem Fall nur sechs der neun Koeffizienten unabhängig.

$$\begin{array}{c}
 \text{m Zeilen} \\
 \downarrow
 \end{array}
 \begin{array}{c}
 \text{n Spalten} \quad \rightarrow \\
 \left[\begin{array}{cccc}
 a_{11} & a_{12} & a_{13} & \dots \\
 a_{21} & a_{22} & a_{23} & \dots \\
 a_{31} & a_{32} & a_{33} & \dots \\
 \dots & \dots & \dots & a_{mn}
 \end{array} \right]
 \end{array}$$

Abbildung 7: Darstellung einer Matrix

Im Rahmen der DTI bedeutet der Begriff Tensor, dass einem Voxel (entspricht einem 3-dimensionalen Bildpunkt) nicht nur ein einzelner Wert, sondern eine komplette Matrix zugeordnet wird. Diese kann aus den Diffusions-Werten verschiedener diffusions-gewichteter Sequenzen errechnet werden, in denen die räumliche Ausrichtung des Gradientenfeldes variiert.

Zusätzlich zu einem b0-Bild, welches keine Diffusionswichtung beinhaltet, sind mindestens sechs richtungsabhängige Diffusionen notwendig⁸⁵, deren Diffusionskoeffizienten mithilfe eines Tensors einem Voxel zugeordnet werden. Dadurch verlängert sich die Dauer der Messsequenzen deutlich im Vergleich zur herkömmlichen diffusionsgewichteten Bildgebung. Darüber hinaus ist es empfehlenswert, aufgrund der Störanfälligkeit der einzelnen Messungen, mehrere Wiederholungen pro Diffusionsrichtung durchzuführen und anschließend Mittelwerte für die jeweilige Richtung zu errechnen.

Um eine qualitativ adäquate Bestimmung des Diffusionstensors durchführen zu können, ist es notwendig, dass die Verteilung der Gradienten gleichmäßig ist, und dass diese dieselbe Stärke aufweisen. Zudem müssen alle Wiederholungen selbstverständlich dieselbe Auflösung besitzen, die Position der Probe im Raum darf nicht verändert werden.

⁸⁵ Bassar PJ et al., 1998

2.7 Apparent Diffusion-Coefficient

Durch Verlängerung der Dauer des Gradientenfeldes lässt sich der b-Wert erhöhen (s. Formel 2), und somit kommen Unterschiede zweier Gewebearten, was die Diffusionseigenschaften betrifft, deutlicher zum Vorschein.

In der Natur sind jedoch der freien Diffusion in jedem organischen Gewebe durch Widerstände auf mikroskopischer als auch auf molekularer Ebene Hindernisse in den Weg gelegt, was die Errechnung eines Diffusionskoeffizienten in hyalinem Knorpel als schwierig gestaltet. Die Größenverhältnisse und Abstände dieser Hindernisse können hierbei variieren.

Dem Diffusionskoeffizienten sind gewisse Grenzen gesetzt. In Abhängigkeit von der Dauer des einwirkenden Gradientenfeldes ergeben sich theoretisch folgende zwei Szenarien:

1. Δ ist zu kurz gewählt:

→ Trotz Widerständen erhält man das Ergebnis einer freien Diffusion, da bereits vor Erreichen einer Barriere ausgelesen wird.

2. Δ ist zu lang gewählt:

→ Trotz nahezu freier Diffusion geraten die Wassermoleküle an alle Barrieren in ihrer Umgebung und die ADC erreicht einen minimalen Wert.

Der Abstand der Gradientenfelder Δ muss sich demzufolge zwischen diesen beiden Maxima befinden und optimiert werden, um eine bestmögliche Signalintensität und Diffusionswichtung zu erhalten.

Da die Diffusion in hyalinem Knorpel durch oben genannte Behinderungen nicht frei ist, sondern gewissen Einschränkungen unterliegt, bedient man sich bei der Diffusions-Tensor-Bildgebung des sogenannten ADC (= Apparent Diffusion Coefficient = Anscheinender Diffusions-Koeffizient), welcher unter anderem abhängig

von der Umgebungstemperatur, der Diffusionszeit und der Dauer des Diffusionspulses ist.

ADC besitzt die Einheit [mm²/s] und beschreibt somit, in welchem Maße Wassermoleküle richtungsabhängig in Gewebe diffundieren können. Die Richtungskomponente spielt hierbei – im Gegensatz zur mittleren Diffusion – eine entscheidende Rolle. Im Folgenden wird der ADC als entscheidender Parameter der Diffusion angegeben.

2.8 Berechnung und Bedeutung der Eigenvektoren

Der Diffusionstensor kann in einer Basis dargestellt werden, in der alle Nicht-Diagonalelemente gleich null sind. Die drei Vektoren dieser Basis werden Eigenvektoren ($\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$) genannt, die Diffusion der Eigenvektoren wird als Eigenwert (λ) bezeichnet. Der Eigenvektor mit dem höchsten Eigenwert gibt die errechnete Richtung im Koordinatensystem an, in welche die Diffusion am größten ist.

Die mittlere Diffusivität (MD) lässt sich aus den drei Eigenwerten der drei Eigenvektoren (je ein Eigenvektor pro Achse im Koordinatensystem) berechnen:

$MD = (\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3)/3.$	[4]
---	-----

Formel 4: Berechnung der mittleren Diffusivität

Zudem lässt sich anhand der Eigenvektoren unter anderem die Fraktionelle Anisotropie (siehe Formel [5]) errechnen und sie liefern die Basis für die visuelle Darstellung der Diffusion (Ellipsendarstellung, MR-Traktographie und andere).

2.9 Berechnung und Bedeutung der Fractional Anisotropy

Ein weiterer bedeutender Parameter in der Diffusions-Tensor-Bildgebung ist die Fractional Anisotropy (FA). Diese beschreibt die strukturelle Ordnung innerhalb eines Gewebes. Die Diffusion in biologischem Gewebe wird durch bestimmte Hindernisse und strukturelle Eigenschaften deutlich behindert und unterscheidet sich somit stark von freier Diffusion in Wasser.

Hat die Richtung der Diffusion keinerlei Einfluss auf den ADC, so spricht man von Isotropie. Dies ist nur in absolut homogenem Gewebe, wie zum Beispiel freier Flüssigkeit oder Nekrosearealen mit zerfallenen Zellstrukturen, der Fall.

Anisotropie bedeutet, dass das Gewebe die Diffusion in verschiedene Richtungen durch bestimmte Hindernisse unterschiedlich stark begrenzt, das Gewebe also eine strenge Ordnung aufweist.

Je höher die FA, desto limitierter und gerichteter ist die Diffusion. Die einzelnen Diffusionen mit unterschiedlicher Richtungskomponente unterscheiden sich in diesem Fall stark. In Nervenfasern beispielsweise ist die Diffusion entlang der Fasern nahezu frei möglich, quer zum Faserverlauf jedoch deutlich eingeschränkt. Die Diffusionen entlang unterschiedlicher Richtungen unterscheiden sich demzufolge deutlich.⁸⁶ Diese Eigenschaft würde sich in einem hohen FA-Wert widerspiegeln.

Ein Wert von 1 spricht für vollkommene Anisotropie. In Geweben mit dem FA-Wert 0 ist der ADC in alle Richtungen identisch.

Die FA errechnet sich aus den drei Eigenwerten der Diffusionstensoren:

$$FA = \frac{\sqrt{3 \times [(\lambda_1 - \langle \lambda \rangle)^2 + (\lambda_2 - \langle \lambda \rangle)^2 + (\lambda_3 - \langle \lambda \rangle)^2]}}{\sqrt{2 \times (\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2)}} \quad [5]$$

Formel 5: Berechnung der Fractional Anisotropy

In hyalinem Gelenkknorpel konnten FA-Werte von etwa 0,04 bis 0,28 gemessen werden, mit Maxima im Bereich der Tangential- und Radiärzone.⁸⁷

⁸⁶ Pierpaoli C et al., 1996

⁸⁷ Filidoro L et al., 2005

2.10 Signal-Rausch-Verhältnis

Das Signal-Rausch-Verhältnis (engl. Signal-to-noise ratio = SNR) ist ein wichtiger Messparameter, um die Bildqualität von MRT-Aufnahmen zu charakterisieren. Es wird durch das Verhältnis aus Signalintensität und dem Bildrauschen bestimmt.

Um die SNR von MRT-Aufnahmen mit Single Channel Spulen zu berechnen, wird der Quotient aus der Signalintensität des zu untersuchenden Gewebes, hier also des Knorpels, und der Standardabweichung des Bildrauschens in einem Bereich wie der das Präparat umgebenden Luft errechnet. Hinzu kommt aufgrund der Ryleigh-Verteilung des Rauschens ein Korrekturfaktor von 0,657.⁸⁸

Bilder mit einer niedrigen SNR wirken unscharf und grobpixelig. Die Bildqualität lässt sich jedoch verbessern, indem man das Messvolumen der Voxel erhöht, die Anzahl der Messwiederholungen erhöht, das Field-of-View vergrößert, die Schichtdicke vergrößert, die Bandbreite reduziert, oder auch ein größeres Magnetfeld wählt.

Die SNR hat somit indirekte Auswirkungen auf die Akquisitionszeit, die Gesamtdauer der Messreihe.

2.11 Diffusions-Tensor-Bildgebung und Anwendung in der klinischen Routine/Forschung

Vor allem in der Neuroradiologie hat die Diffusions-Tensor-Bildgebung Einzug in die Klinik gefunden, sie dient unter anderem der präoperativen Planung bei der Therapie von Gehirntumoren.⁸⁹ In der neuroradiologischen Forschung findet sie Anwendung in der Erforschung von Grundlagen der Epilepsie.⁹⁰

Des Weiteren gibt es Ansätze in der Diagnostik von Prostata-Carcinomen⁹¹ und des hyalinen Gelenkknorpels. Was die DTI des Gelenkknorpels betrifft, konnten erste Korrelationen mit dem Faserverlauf der Kollagenfasern nachgewiesen werden.⁹² Zudem konnte eine Korrelation der DTI mit dem Proteoglykangehalt gefunden

⁸⁸ Dietrich O et al., 2007

⁸⁹ Lo CY et al., 2007

⁹⁰ Wang XQ et al., 2010

⁹¹ Manenti G et al., 2007

⁹² deVisser SK et al., 2007; Raya JG et al., 2011

werden⁹³, im Hochfeld-MRT (17.6 Tesla) zeigte sich ein Anstieg des mittleren ADC bei Osteoarthritis.⁹⁴

⁹³ Meder R et al., 2006

⁹⁴ Raya JG et al., 2008

3. Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Es wurden Leichenpatellae aus dem Institut für Rechtsmedizin der LMU München verwendet. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Entnahme der Proben möglichst zeitnah zum vermuteten Todeszeitpunkt erfolgte.

Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Patellae in eine mit physiologischer Kochsalzlösung befeuchtete Frischhaltefolie eingewickelt, in eine Plastikfrischhaltebox gelegt und bis zur weiteren Verarbeitung bei +8°C im Kühlschrank aufbewahrt. Diese Lagerung gewährleistet einen Schutz vor Austrocknung und schnellen Verwesungsprozessen, ohne dabei die Integrität der Knorpelstrukturen zu beschädigen, wie es etwa bei Lagerung in der Gefriertruhe auftreten kann.⁹⁵



Abbildung 8: Patella-Nr. 24, männlich, 25 Jahre. Nach Entnahme der Bohrproben

⁹⁵ Grushko et al, 1989

Nicht weiter aufgearbeitet wurden Patellae, bei denen makroskopisch klar erkennbare, bei Entnahme aufgetretene Verletzungen den Knorpel beschädigt hatten, als auch diejenigen, die bereits sehr ausgeprägte traumatisch oder arthrotisch bedingte Veränderungen, wie zum Beispiel Osteophytenbildung oder stark reduziertes Knorpelvolumen, aufzeigten.

Die MRT-Messungen fanden spätestens zwei Tage (< 30 Stunden) nach Entnahme der Patellae statt, meist aber noch am selben Tag (innerhalb acht bis zehn Stunden nach Entnahme).

Um die Patellae darauf vorzubereiten, wurde zunächst alles überschüssige Binde-, Fett-, Muskel- und Sehngewebe entfernt, und die Patella mit der ventralen Seite nach unten mit Hilfe von Hystoacryl-Gewebekleber (Histoacryl, B. Braun Surgical GmbH, Melchingen) auf einer 10 x 10 cm großen, ca. 3 bis 4 mm dicken Plexiglasscheibe befestigt. Es wurde darauf geachtet, dass die Ausrichtung der oben liegenden Knorpelseite möglichst der natürlichen, physiologischen Lage im Gelenk entsprach.

Abschließend wurde die Patella mit einer Digitalkamera (HP Photosmart R817) im Macro-Modus fotografiert, um die Intaktheit des Knorpels festzuhalten.

Vor Beginn der Messung im Kernspintomographen wurden die Patellae für ca. 45 Minuten bei Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wurde die Plexiglasplatte, auf der man zuvor die Patella fixiert hatte, auf einem MR-tauglichen, nicht magnetischen Schlitten aus Plexiglas und Plastik befestigt (siehe Abbildung 8).

Nun wurde der Knorpel mit 0,9% Kochsalzlösung befeuchtet, sodass sich ein dünner Wasserfilm auf der Oberfläche bildete. Dies simuliert am ehesten die physiologische Umgebung des Knorpels mit Synovialflüssigkeit im gesunden Gelenk. Abschließend wurde der Schlitten mitsamt der Patella in Frischhaltefolie eingewickelt, um während der Messung einen Schutz vor Verdunstung und somit einen konstanten Zustand des Knorpels und seiner Umgebung zu gewährleisten.

Die DTI-Messungen wurden an einem 1,5 Tesla Magnetom Sonata Maestro Class (Siemens Medical Solutions, Erlangen, Deutschland; maximale Gradientenstärke: 40mT/m, maximaler Gradientenanstieg: 200mT/m/ms) MRT-Scanners im Institut für Klinische Radiologie, Klinikum Grosshadern bei Raumtemperatur ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) durchgeführt.

Mit Hilfe eines speziell angefertigten Schlittens (siehe Abbildung 9) wurde die Patella vor Messbeginn in eine kommerzielle zirkular polarisierte Extremitätenspule (= small extremity coil) eingebracht.

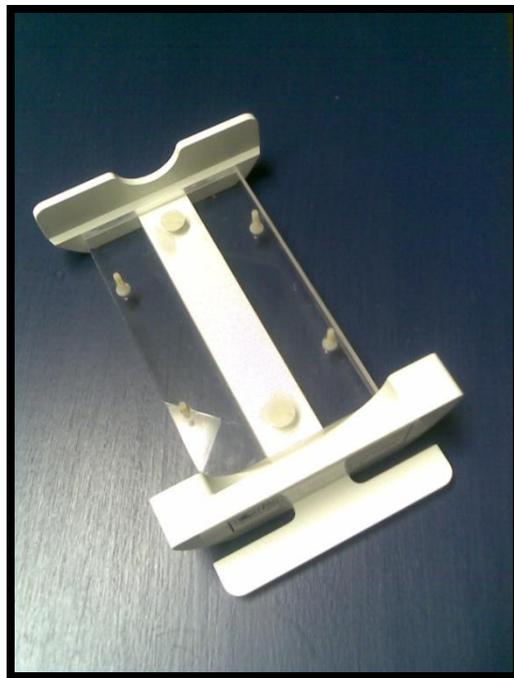


Abbildung 9: Schlitten zum Einbringen der Patella in die Small Extremity Coil

Im Anschluss an die DTI erfolgte die Entnahme von Bohrproben für die weitere Aufarbeitung (siehe Abbildung 8). Zur Bestimmung des Wassergehaltes erfolgte die Trocknung der Proben direkt vor Ort, die histologische und rasterelektronenmikroskopische Aufarbeitung erfolgte im Institut für Anatomie der LMU München.

3.2 Methodik

Es wurden insgesamt 43 Patellae entnommen, woraus 30 DTI-Datensätze angefertigt werden konnten. Eine histologische Auswertung erfolgte bei insgesamt 28 Patellae, Rasterelektronenmikroskopie bei 33 Patellae, und die Bestimmung des Wassergehaltes bei 27 verschiedenen Patellae.

Patella-Nr.	Geschlecht	Seite	Alter (Jahre)	DTI	Histologie	REM	Wassergehalt
Pat. 15	männlich	links	16	X	X	X	
Pat. 16	weiblich	links	37	X	X	X	
Pat. 17	weiblich	rechts	90		X	X	
Pat. 18	weiblich	links	26	X	X	X	X
Pat. 19	männlich	links	67	X	X	X	X
Pat. 20	männlich	links	62	X	X	X	X
Pat. 21	weiblich	links	77		X	X	X
Pat. 22	männlich	rechts	20		X	X	X
Pat. 23	männlich	links	33	X	X	X	X
Pat. 24	männlich	links	25	X	X	X	X
Pat. 25	weiblich	links	94	X			
Pat. 26	männlich	links	30	X		X	
Pat. 27	männlich	rechts	17	X		X	
Pat. 28	männlich	links	92	X	X	X	X
Pat. 29	männlich	links	23		X	X	X
Pat. 30	männlich	links	32		X	X	X
Pat. 33	männlich	links	36	X		X	X
Pat. 34	männlich	links	33	X	X	X	X
Pat. 36	weiblich	links	24	X	X	X	X
Pat. 37	weiblich	links	29	X	X	X	X
Pat. 38	männlich	links	20	X	X	X	X
Pat. 39	männlich	links	37	X	X	X	X
Pat. 40	männlich	rechts	35	X	X	X	X
Pat. 43	männlich	links	16	X	X	X	X
Pat. 45	männlich	rechts	21	X		X	X
Pat. 46	männlich	rechts	37	X			X
Pat. 47	männlich	rechts	34	X	X	X	X
Pat. 48	männlich	links	20	X		X	
Pat. 49	männlich	rechts	35	X	X	X	
Pat. 51	weiblich	rechts	47	X	X	X	X
Pat. 52	männlich	rechts	79	X	X	X	X
Pat. 54	männlich	rechts	10	X	X	X	X
Pat. 55	weiblich	rechts	55	X	X	X	X
Pat. 56	weiblich	links	60	X	X	X	X
Pat. 57	männlich	links	45	X	X	X	X

Tabelle 1: Übersicht über alle verwendeten Patellae und durchgeführten Messungen

3.2.1 Diffusions-Tensor-Bildgebung

3.2.1.1 Parameter und Einstellungen

Im Rahmen der MR-Messungen wurden insgesamt je elf Sequenzen angefertigt. Zu Beginn wurden zwei Lokaliser-Sequenzen angefertigt, um ein weitgehend identisches Field of View (FOV) festlegen zu können.

Im Anschluss erfolgte eine Fast Low Angle SHot-Sequenz (FLASH), welche die Eigenschaft besitzt, den hyalinen Knorpel signalreich abzubilden. Eine Auflösung (Matrix-Größe) von 256 x 256 Bildpunkten mit einer Voxelgröße von 0,54 x 054 mm² wurde hierfür gewählt.

Für die Diffusions-Tensor-Messung wurden insgesamt sieben Messdurchgänge benötigt: Initial eine Messung ohne Diffusionswichtung, im Anschluss sechs weitere Messungen mit identischer Diffusionswichtung und jeweils verschiedenen Diffusionsrichtungen.

Folgende Parameter wurden verwendet:

	FLASH	DTI (b0)	DTI (b500)
TR (=Repetitionszeit)	21 ms	1450 ms	1450 ms
TE (=Echozeit)	9,06 ms	53 ms	53ms
Base Resolution (=Auflösung)	256x256	128x128, zero filled to 256x256	128x128, zero filled to 256x256
FoV (Field of View)	140x140 mm ²	140x140 mm ²	140x140 mm ²
In-plane Resolution (mm ²)	0.54 x 0.54	0.54 x 0.54	0.54 x 0.54
Anzahl der Schichten	20	20	20
Schichtdicke (mm)	3	3	3
Bandwidth (=Bandbreite)		130.0 Hz/Pixel	130.0 Hz/Pixel
Flip-Winkel	-	90°/180°	90°/180°
Wiederholungen	1	6	6 x 6
b-Wert (s/mm ²)		0	500
Gesamte Meßdauer	1,8 min	18,6 min	6 x 18,6 min
Richtungen der b500: 110; -110; 101; -101; 011; -011			

Tabelle 2: Parameter und Einstellungen der MR-Messungen

Zur Optimierung des Signal-Rausch-Verhältnisses (SNR) entschied man sich für je sechs Wiederholungen pro Diffusion. Eine native Matrix-Größe von 128 x 128 Voxeln

wurde gewählt, im Anschluss erfolgte eine Interpolation auf 256 x 256 Voxel durch Zero-Filling. Diese Einstellungen ermöglichten eine ausreichend hohe SNR bei noch praktikabler Messdauer. Im Vergleich zu einer einzelnen Messung bewirkt die Erhöhung auf insgesamt 6 Messungen einen Anstieg der SNR um knapp 250% ($\sqrt{6} = 2.49$).

Zu Beginn der Messreihe wurden insgesamt 12 Patellae mit einer DTI-Auflösung von 256 x 256 Voxeln (Interpolation auf 512 x 512) untersucht. Da für die höhere Auflösung längere Messzeiten in Kauf genommen werden mussten, wurden hier nur drei Wiederholungen pro Diffusionswinkel durchgeführt. Zu diesen Proben liegen lediglich die MR-Daten vor, es wurden keinerlei Bohrproben entnommen. Vollständigkeitshalber seien diese Messungen hier erwähnt.

Da die Akquisitionszeit bei höherer Auflösung pro Patella bei weit über vier Stunden lag, entschloss man sich die Ortsauflösung zu reduzieren. Um dennoch für eine stabile Messung ausreichend gute SNR-Werte zu erhalten, wurde die Anzahl der Wiederholungen erhöht.

3.2.1.2 Verarbeitung und Auswertung der Rohdaten

Die weitere Auswertung begann mit einer semi-automatischen Segmentierung des Knorpels mithilfe der Software PaCaSe (Patellar Cartilage Segmentation; Lorenz König et al.) statt. Hierbei wurden, nach Durchsicht aller 20 Schichten, die fünf zentralen Schichten festgelegt, welche sich durch die höchste Knorpeldicke auszeichneten.

Die so angefertigten Segmentierungen wurden nun in MatLab (Mathworks 2011b) eingelesen, um die ADC- und FA-Werte des Knorpels mithilfe eines selbstgeschriebenen Programmes errechnen zu können. Hierfür wurde eine halbautomatische Rechenroutine erstellt, welche den gesamten Knorpel in je zwei Layers und vier Sektoren unterteilt. Layer 1 beschreibt die oberflächennahe Knorpelhälfte, Layer 2 die tieferen Knorpelanteile bis hin zur Knorpel-Knochen-Grenze.

Zudem erfolgte die sagittale Unterteilung in vier Sektoren, welche eine vereinfachte Aufteilung des Retropatellarknorpels in die mediale und laterale Facette ermöglichte. Es entsprechen jeweils zwei Sektoren der medialen Facette und 2 Sektoren der lateralen Facette. Hierfür wurde darauf geachtet, ob es sich bei dem gemessenen Präparat um eine linke oder rechte Patella handelte.

Die Matlab-Auswertung lieferte Mittelwerte und Standardabweichungen für den gesamten Knorpel, die einzelnen Layer sowie Sektoren und gab diese in Form einer Excel-Tabelle aus.

Zudem wurden jeweils für die FA, als auch den ADC eine Map pro Patella und Schicht erstellt, welche es durch Farbcodierung erlaubten, sich bereits frühzeitig einen Eindruck über die Qualität der Messungen zu verschaffen.

Die Erstellung der Tabellen und Grafiken wurde mithilfe von MS Excel 2010 durchgeführt.

3.2.2 Histologie – Vorbereitung und Entnahme der Bohrproben

Mithilfe einer handelsüblichen Bohrmaschine mit Hohlbohrer (diamantbeschichtet; Außendurchmesser: 7 mm; Innendurchmesser: 6 mm) wurden mehrere im Durchmesser 6 mm fassende Knorpel-Knochenzylinder angefertigt. In Abhängigkeit der Patellagröße und des Knorpelzustandes wurden pro Patella insgesamt zwischen vier und acht Proben entnommen, dabei immer mindestens zwei pro Facette.

Insgesamt wurden somit aus 32 Patellae 143 Zylinder entnommen. 55 stammten aus den medialen, 88 aus den lateralen Facetten. Davon wurden 60 für die histologische Auswertung und 52 für die rasterelektronische Auswertung weiterverarbeitet. 31 dienten der Bestimmung des Wassergehalts im Knorpel.

Die Bohrungen fanden nur an Stellen statt, an denen keine makroskopischen Knorpelschäden erkennbar waren. Es wurde stets darauf geachtet, die Knorpeloberfläche nicht zu beschädigen und in intaktem Zustand zu belassen.

Gebohrt wurde immer senkrecht zur Knorpeloberfläche. Dabei wurde versucht Zylinder anzufertigen, die einen konstant gleichmäßig dicken Knorpel besitzen, wodurch in der weiteren Verarbeitung gleichförmige Schnitte ermöglicht wurden.

Um den Knorpel vor Denaturierung durch beim Bohren entstehende Hitze zu schützen, wurden Bohrer und Patella während des gesamten Bohrvorgangs mit auf 8°C gekühlter 0,9% NaCl-Lösung umspült.

Sobald man mit dem Bohrer die Compacta durchbrochen hatte und die Spongiosa erreicht hatte, konnten die Knorpelzylinder mithilfe eines kleinen Schlitzschraubenziehers unter Aufwendung von geringem Druck herausgebrochen werden.

3.2.2.1 Safranin-O-Färbung und Photometrie

Vorbereitung:

Die Knorpel-Knochenzylinder, die für die histologische Weiteruntersuchung vorgesehen waren, wurden für mindestens 48 Stunden in PFA (Paraformaldehyd; 4%; phosphatgepuffert; pH 7,2) eingelegt.

Um den Knochenanteil der Bohrzylinder weich und schneidbar zu machen, wurden diese Zylinder für etwa vier bis sechs Wochen in 7% EDTA im Brutschrank bei 37°C entkalkt. EDTA-Reste wurden entfernt, indem die Proben zwei Stunden lang kontinuierlich unter fließendem Wasser gespült wurden.

Es folgte eine aufsteigende Alkoholreihe (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% Ethanol, jeweils eine Stunde) zur Entwässerung der Proben, und anschließend eine Lagerung der Proben für insgesamt zwei Stunden in Xylol, welches als Intermedium diente.

Nun folgte das Einbetten der Knorpel-Knochen-Zylinder in flüssiges Paraffin. Im Kühlschranks kühlten die Proben ab und härteten aus, damit man sie am Mikrotom (Schlittenmikrotom, Jung AG Heidelberg, Anatomische Anstalt der LMU München) in ca. 4 – 5 µm dicke Scheiben schneiden konnte. Jeweils 3 aufeinanderfolgende

Schnitte wurden auf Objektträgern (Menzel-Gläser, SuperFrost) aufgezogen und über Nacht bei 40°C im Brutschrank gelagert.

Färbung:

Um die GAG unserer Knorpelproben anzufärben, wurde eine gepufferte Safranin-O-Färbung (in 0,5M Natriumacetat, pH 4,6)⁹⁶ verwendet. Damit war mittels einer Graustufenanalyse im späteren Verlauf eine Quantifizierung des Proteoglykangehaltes möglich. Auf eine Gegenfärbung mit Fast Green wurde in dieser Arbeit bewusst verzichtet, da diese die quantitative Messung des Glykosaminoglykangehaltes nur behindern würde.⁹⁷

Zunächst wurden die Schnitte auf einer Heizplatte für ca. 10 Minuten eingebrannt, dadurch verflüssigte sich das Paraffin und löste sich so später besser in Xylol auf. Zur Entparaffinierung wurden die Schnitte nun zweimal für 5 Minuten in Xylol gestellt. Es folgte eine aufsteigende Alkoholreihe (100%, 96%, 90%, 80%, 70% Ethanol; für je 5 Minuten).

Die Objektträger wurden für die Färbung 7 Minuten in Safranin-O getaucht, anschließend mit Aqua dest. gespült und kurz in Ethanol geschwenkt. Es folgte ein weiteres Einlegen in Xylol für zweimal 5 Minuten.

Die Objektträger wurden mit Eindeckmittel bedeckt (Merck Neo-Mount), anschließend folgte das luftblasenfreie Aufbringen der Deckgläser (Menzel-Gläser). Die Objektträger härteten über Nacht bei Raumtemperatur aus.

Photometrie:

Mithilfe einer Lupe (Wild Makroskop M420) wurden Fotografien der histologischen Schnitte angefertigt. Hierzu wurden ein Objektiv (Vergrößerung 0,5x) und ein weiterer Aufsatz (Vergrößerung 1,25x) verwendet. Alle Proben wurden unter identischer Beleuchtung und konstanten Umgebungsbedingungen fotografiert, im digitalen Bildbearbeitungsprogramm KS.400 wurden die Helligkeit auf 0,6 und der Kontrast auf 0,93 eingestellt. Eine selbst modifizierte Auswertungsroutine lieferte die

⁹⁶ Kiraly K et al., 1996

⁹⁷ Bulstra SK et al., 1993

Anfärbungsintensität der Proteoglykane in Grauwerten. Die einzelnen Rechenschritte sind Appendix 1 zu entnehmen.

Es wurde manuell eine ROI (Region of Interest) auf das Foto gelegt (s. Abbildung 10 und 11). Hierbei wurde darauf geachtet, einen möglichst repräsentativen Bereich abzubilden. Diese ROI wurde mit Hilfe der Auswertesoftware von der Knorpeloberfläche bis hin zur Knorpel-Knochen-Grenze in 9 gleich große Sub-ROIs (im Folgenden auch als Felder 1 bis 9 bezeichnet) unterteilt, wobei Feld 1 an der Gelenkfläche liegt, Feld 9 markiert das Tide Mark. Die gemessenen Mittelwerte wurden für jede der 9 Sub-ROIs ausgegeben und ermöglichten eine Abschätzung des Safranin-O-Gehaltes und somit Rückschlüsse auf den Proteoglykangehalt. Je höher der Grauwert (Maximum 255), desto heller erscheint das Bild in der Safranin-O-Färbung, und desto geringer ist demzufolge der darin enthaltene Proteoglykangehalt.

Abschließend wurde noch ein Screenshot gemacht, um die Fotografie um die 9 ROIs zu dokumentieren (s. Abbildung 10 und 11).

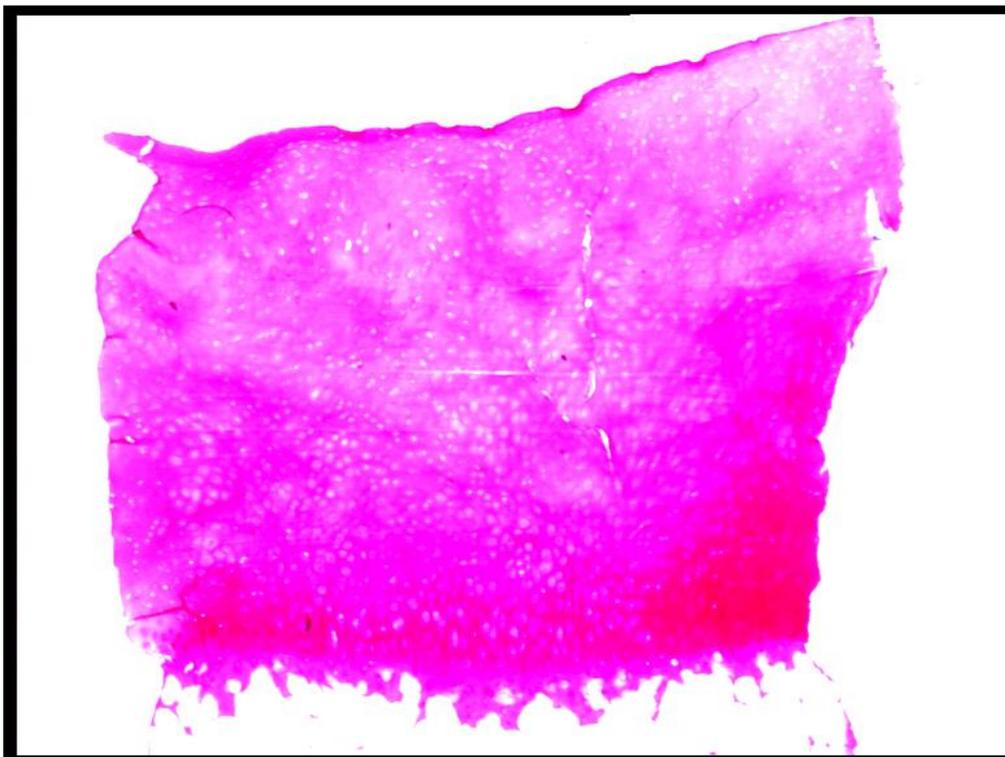


Abbildung 10: Patella 22, laterale Facette, Safranin-O-Färbung, Vergrößerung: 16x6,25

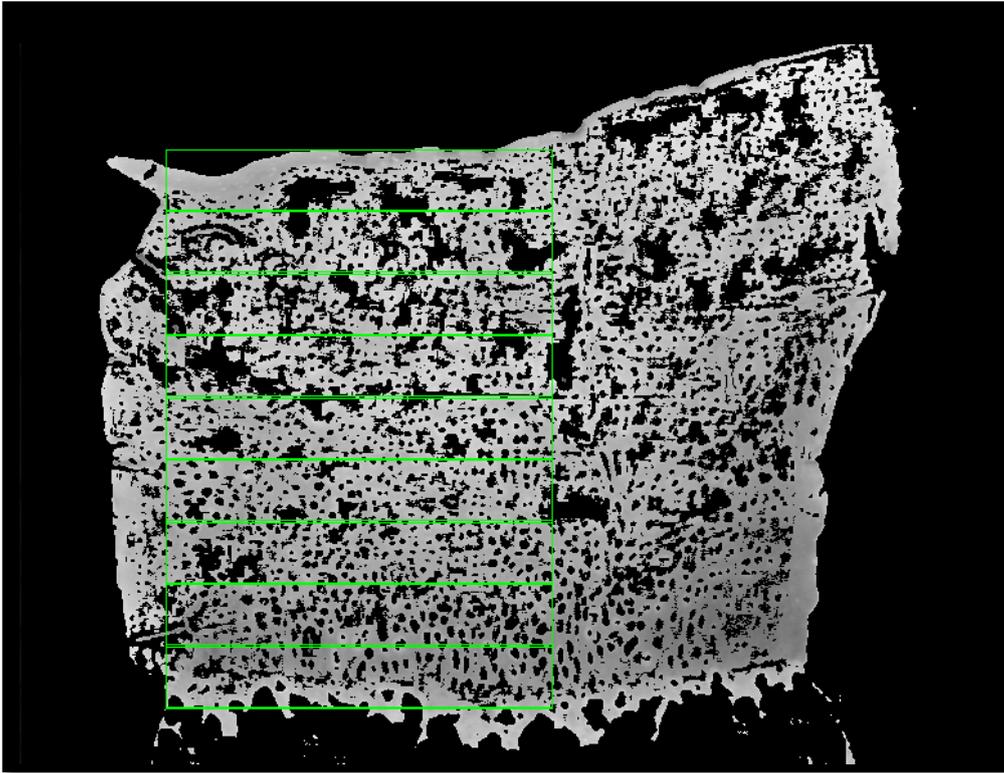


Abbildung 11: Patella 22, laterale Facette, Safranin-O-Färbung, Vergrößerung: 16x6,25 + Unterteilung in 9 Felder

Bei Patellae mit mehreren repräsentativen Bohrproben wurden die ROIs miteinander gemittelt. Ebenso wurden im Rahmen der weiteren Auswertung die Mittelwerte für je 2 Layer bestimmt. Man erhielt so die Möglichkeit, die Proteoglykandichte in der knochennahen Knorpelhälfte sowie im oberflächlichen Knorpel abschätzen zu können.

3.2.2.2 Bestimmung des Wassergehalts

Im Anschluss an die Bohrungen für die histologischen und rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden noch weitere Bohrzylinder entnommen, um den Wassergehalt des jeweiligen Knorpels zu bestimmen. Der Wassergehalt dient als Indikator für frühe degenerative Veränderungen. Im Frühstadium einer degenerativen Veränderung kommt es zu einer Zunahme des intrakartilaginären Wassergehaltes, welche durch die Auffaserung des Kollagens

verursacht wird.⁹⁸ Im Alter nimmt der Wassergehalt des Gelenkknorpels allerdings physiologisch ab, wodurch es zu einer Abnahme der Druckelastizität kommt⁹⁹, was ebenfalls eine arthrotische Degeneration begünstigt. Als Normwerte des Wassergehaltes in intaktem Gelenkknorpel werden in der Literatur Werte zwischen ca. 60 und 70% angegeben. Die Bohrproben wurden erneut durch Spülen mit 0,9% NaCl gereinigt und nun mit einem Tuch vorsichtig getrocknet.

Im Anschluss erfolgte das erste Wiegen. Hierfür wurde eine gewöhnliche, auf 0,1 mg exakt kalibrierte Feinwaage verwendet. Nach Trocknen des Knorpelzylinders im Wärmeschrank für ca. sechs Stunden bei 60° C erfolgte das zweite Wiegen. Um den Wassergehalt des Knorpels berechnen zu können, wurde abschließend die Differenz aus Feuchtgewicht und Trockengewicht gebildet und durch das Feuchtgewicht geteilt. Somit ergab sich ein prozentueller Wasseranteil am Gesamtgewicht der entnommenen Knorpelprobe (s. Formel 6).

$\text{Wassergehalt} = (m_{\text{feucht}} - m_{\text{trocken}}) / m_{\text{feucht}}$	[6]
--	-----

Formel 6: Berechnung des Wassergehalts Knorpels

3.2.3 Rasterelektronenmikroskopie

Vorbereitung der Proben:

Auch bei der Vorbereitung für die Elektronenmikroskopie war es wichtig, dass die Bohrungen möglichst senkrecht zur Knorpeloberfläche stattfanden, um die anschließende Auswertung der zonalen Gliederung zu vereinfachen. Nachdem der Knorpel-Knochen-Zylinder nun durch Spülen mit 0,9% NaCl gereinigt wurde, wurde der Knochen mit einer kleinen Säge so weit gekürzt, dass noch etwa 4 mm Knochen am Zylinder erhalten blieben. Am Boden der so erhaltenen Probe wurde abschließend mit der Säge eine kleine Einkerbung durchgeführt, welche das spätere Spalten erleichterte.

Die Proben wurden dann für ca. 24 Stunden in 2-molarer CaCl₂-Lösung bei Raumtemperatur (20 ± 2°C) inkubiert, wodurch eine Proteoglykanextraktion erreicht

⁹⁸ Burstein D et al., 2000

⁹⁹ Schiebeler TH, Korf HW, 2007; Venn M, Maroudas A, 1977

wurde, welche im späteren Verlauf eine bessere Darstellung der Kollagenfasern ermöglichte. Dieser Status wurde im Anschluss durch mindestens 24-stündiges Einlegen der Proben in 4% phosphatgepuffertes Formalin (PFA, pH 7,2) fixiert.

Die Zylinder wurden nun in eine aufsteigende Azetonreihe (50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%, zu je 30 Minuten, anschließend zweimal je eine Stunde in 100% Azeton) eingebracht, was eine vollständige Entwässerung der Proben bewirkte. Im Anschluss erfolgt die Trocknung der Proben nach der Critical-Point-Methode (Bal-Tec CPD 030): Durch mehrmaliges Erhitzen und Abkühlen der Knorpel-Knochen-Zylinder unter Zugabe von Kohlendioxid wurde das Azeton verdrängt. Dadurch wurde einer eventuellen Gewebezzerstörung durch Flüssigkeitsverdampfung im Vakuum des Rasterelektronenmikroskops vorgebeugt. Die nun soweit vorbereiteten Proben konnten bis zur weiteren Verarbeitung im Exsikkator aufbewahrt werden.

Um die Kollagenfaserarchitektur im Elektronenmikroskop beurteilen zu können, bedarf es einer gebrochenen Kante. Diese wurde unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff und Hammerschlag auf eine aufgesetzte Skalpellklinge hergestellt. Somit wurden Schnittartefakte, die durch das Zusammendrücken der Kantenoberfläche ein späteres Beurteilen der Faserverläufe nahezu unmöglich machen, bestmöglich minimiert.

Die so erhaltenen Zylinderhälften wurden nun mittels leitfähigen Haftaufklebern (Plano GmbH) auf spezielle Objektträger aufgebracht und anschließend durch kalte Kathodenentladung (2,4 kV, 20mA) in einem Polaron SEM Coating System mit einer 300 Ångström (= 30 nm) dicken Goldschicht besputtert. Proben mit sehr geringer Auflagefläche wurden dann noch durch Auftragen von Leitsilber auf dem Objektträger fixiert.

Analyse der Proben:

Die Proben wurden mithilfe eines Rasterelektronenmikroskops der Marke Jeol (JSM-35CF Scanning Microscope) hinsichtlich der zonalen Gliederung ihrer Kollagenfaserarchitektur ausgewertet. Hierbei wurden lediglich Proben begutachtet, welche sicher im Gefrierbruch gebrochen worden waren, akzidentiell geschnittene Präparate wurden verworfen. Anhand des typischen Faserverlaufs wurden bei einer

6000-fachen Vergrößerung die Grenzen der einzelnen Schichten (Tangentialzone, Transitionalzone, Radiärzone, Tide Mark; siehe Abbildung 2) dargestellt und so die Schichtdicken erfasst. Da eine klare Grenze zwischen den Schichten nicht existent ist, und die Übergangsbereiche zum Teil durchaus dicker sind, wurden folgende 5 Punkte durch Mittelung aus je fünf repräsentativen Durchgängen bestimmt:

- a: sicher noch Tangentialzone
- b: sicher nicht mehr Tangentialzone
- c: sicher noch Transitionalzone
- d: sicher nicht mehr Transitionalzone
- e: sicher noch Radiärzone/Grenze zum Tidemark

Die Abstände der fünf Messpunkte zur Oberfläche des Knorpels wurden bei 20- bis 1000-facher Vergrößerung bestimmt. Die Grenze zwischen Tangential- und Transitionalzone wurde als Mittelpunkt zwischen den Messpunkten a und b errechnet, zwischen c und d liegt demzufolge die Grenze zwischen Transitional- und Radiärzone. Es wurden somit relative zonale Dicken in Abhängigkeit der Gesamtdicke des Knorpels angegeben, diese lassen sich wie folgt berechnen:

Dicke der Tangentialzone: $[a + 1/2*(b - a)]/e$ [7]

Dicke der Tangentialzone: $[c + 1/2*(d - c) - a - 1/2*(b - a)]/e$ [8]

Dicke der Radiärzone: $[e - c - 1/2*(d - c)]/e$ [9]

Formel 7, 8, 9: Berechnung der zonalen Dicken

In einigen Fällen wurden pro Patella mehrere Proben für die Histologie und die REM aufgearbeitet und hieraus im Anschluss die Mittelwerte errechnet, welche dann in die weitere Auswertung einfließen.

Zur Dokumentation der Knorpelbeschaffenheit wurden am Ende der Analyse mehrere repräsentative Bilder mit einer im Elektronenmikroskop eingebauten Kamera (Mamiya 6x7) auf einem handelsüblichen Schwarzweißfilm (Ilford FP4, Iso

125/22°) angefertigt. Zudem wurde in einer 20- bis 26-fachen Vergrößerung eine Übersichtsaufnahme pro Probe erstellt, um ggf. die einzelnen Proben untereinander vergleichen zu können (s. Abbildung 12).

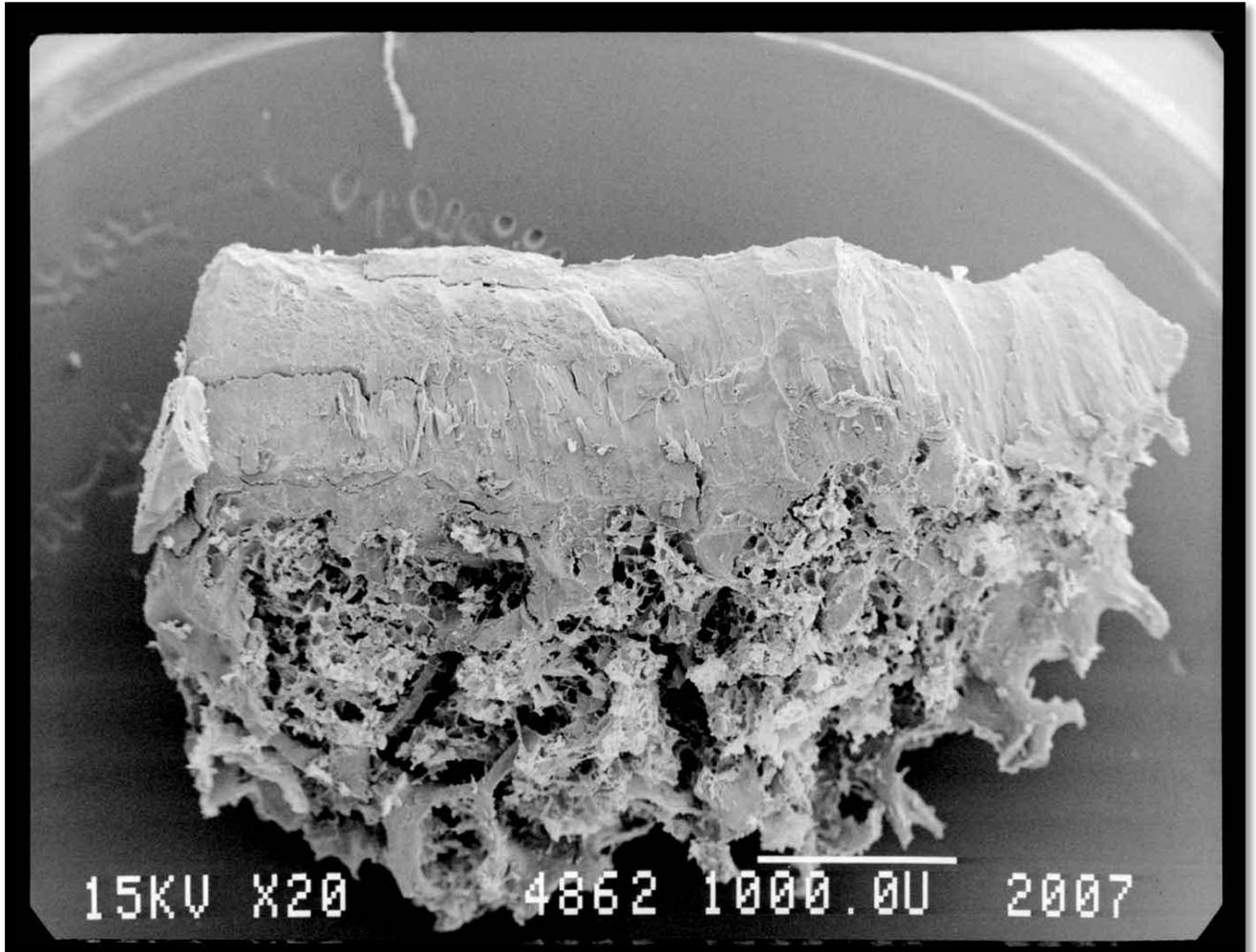


Abbildung 12: Patella 17, Bohrzylinder aus der medialen Facette, Übersichtsaufnahme bei 20x Vergrößerung

3.3 Aufteilung der Patellae in 2 Gruppen

Insgesamt wurden 43 Patellae für die DTI-Messungen entnommen. Bestimmte Proben und Messungen mussten aus verschiedenen Gründen verworfen werden, zum Beispiel aufgrund Abbruchs der Messungen bei Überhitzung des MR-Scanners oder Verwendung der Patellae für diverse Testläufe.

Eine histologische Auswertung erfolgte bei insgesamt 28 Patellae, Rasterelektronenmikroskopie bei 33 Patellae und die Bestimmung des Wassergehaltes bei 27 verschiedenen Patellae.

Unter den 30 für die DTI verwendeten Patellae stammten 22 Stück von männlichen, 8 Stück von weiblichen Leichen, welche im Alter von 10 bis 94 Jahren verstorben waren. Dies entspricht einem durchschnittlichen Sterbealter von 39,1 Jahren mit einer Standardabweichung von 21,9 Jahren. Der mittlere Body Mass Index lag bei $25,1 \pm 5,2 \text{ kg/m}^2$.

Für die weitere Auswertung wurden die Patellae nach dem jeweiligen Sterbealter in zwei Gruppen eingeteilt.

Patellae von Menschen, welche vor dem 45. Lebensjahr verstarben ($n=21$), wurden Gruppe A zugeordnet. Alle anderen Patellae, welche zum Sterbezeitpunkt das 45. Lebensjahr bereits überschritten hatten ($n=9$), wurden in Gruppe B verteilt. Dieser Cut Off wurde gewählt, da ab diesem Alter bereits von präarthrotischen Veränderungen auszugehen ist.

Gruppe A setzt sich aus 17 Proben von männlichen Leichen und vier weiblichen zusammen, das durchschnittliche Sterbealter lag bei 27,2 Jahren bei einer Standardabweichung von 8,4 Jahren. Das niedrigste Sterbealter war 10 Jahre, das höchste 37 Jahre.

Gruppe B beinhaltete fünf männliche Proben und vier weibliche mit einem durchschnittlichen Sterbealter von 66,8 Jahren. Das niedrigste Alter lag bei 45 Jahren, das höchste bei 94 Jahren, somit errechnete sich eine Standardabweichung von 10,0 Jahren.

Die Body Mass Indices lagen nahe beieinander. Der mittlere BMI der Gruppe A betrug $25,0 \pm 5,2 \text{ kg/m}^2$, Gruppe B erreichte $25,2 \pm 5,6 \text{ kg/m}^2$.

Gruppe A - Pat-Nr.	Alter (Jahre)	Geschlecht	Größe (m)	Gewicht (kg)	BMI (kg/m ²)
15	16	männlich	1,74	128	42
16	37	weiblich	1,63	53	20
18	26	weiblich	1,69	69	24
23	33	männlich	1,75	77	25
24	25	männlich	1,78	70	22
26	30	männlich	1,81	72	22
27	17	männlich	1,84	62	18
33	36	männlich	1,67	72	26
34	33	männlich	1,70	75	26
36	24	weiblich	1,75	67	22
37	29	weiblich	1,66	66	24
38	20	männlich	1,85	80	23
39	37	männlich	1,79	83	26
40	35	männlich	1,85	105	31
43	16	männlich	1,82	73	22
45	21	männlich	1,76	84	27
46	37	männlich	1,87	95	27
47	34	männlich	1,78	85	27
48	20	männlich	1,88	85	24
49	35	männlich	1,81	95	29
54	10	männlich	1,55	42	17
Mittelwerte:	26,82		1,76	77,82	24,95

Tabelle 3: Übersicht über alle Patellae der Gruppe A

MATERIAL & METHODEN

Gruppe B - Pat-Nr.	Alter (Jahre)	Geschlecht	Größe (m)	Gewicht (kg)	BMI (kg/m ²)
19	67	männlich	1,71	47	16
20	62	männlich	1,63	70	26
25	94	weiblich	1,50	73	32
28	92	männlich	1,69	80	29
51	47	weiblich	1,61	55	21
52	79	männlich	1,68	50	18
55	55	weiblich	1,57	69	28
56	60	weiblich	1,78	86	27
57	45	männlich	1,81	101	31
Mittelwerte:	66,78		1,66	70,11	25,33

Tabelle 4: Übersicht über alle Patellae der Gruppe B

4. Statistik

Die statistische Auswertung der Rohdaten erfolgte komplett mit dem Kalkulationsprogramm Microsoft Excel 2010.

Zunächst wurde anhand der akquirierten Einzeldaten durch Berechnung des arithmetischen Mittelwerts, der Standardabweichungen und des 95%-Konfidenzintervalls eine deskriptive Statistik erstellt.

Für die Grauwertanalyse, den ADC, die FA, die prozentuale Dicke der Radiärzone und den Wassergehalt wurden vergleichende Tests durchgeführt. Es wurde untersucht, ob sich die eben genannten Parameter in Abhängigkeit des Alters oder des Geschlechts unterscheiden. Ebenso wurde auf Unterschiede zwischen Layer 1 und Layer 2 als auch der medialen und lateralen Facette geachtet.

Um Unterschiede zwischen zwei verschiedenen Gruppen (zum Beispiel männliche im Vergleich mit weiblichen Proben) festzustellen, wurde ein Welch-Test für unabhängige Stichproben angewandt, während in anderen Fällen (zum Beispiel beim Vergleich zwischen Layer 1 und Layer 2) ein Welch-Test für abhängige Stichproben verwendet wurde.

Von einer Signifikanz zum Niveau α wird gesprochen, wenn die errechnete Fehlerwahrscheinlichkeit kleinere Werte als $\alpha = 0,05$ annimmt. In diesen Fällen lässt sich die Nullhypothese (H_0 = die Mittelwerte bezüglich eines bestimmten Merkmals unterscheiden sich zwischen zwei unterschiedlichen Gruppen) ablehnen.

Für die Korrelation des ADC mit der Grauwertanalyse wurden einerseits Streudiagramme (= Scatterplots) erstellt, zum anderen der Korrelationskoeffizient r sowie der Determinationskoeffizient R^2 errechnet.

Der Korrelationskoeffizient r gilt als Maß für die Stärke eines linearen Zusammenhanges, ist dimensionslos und nimmt hierbei Werte zwischen -1 und +1 an. Nimmt $|r|$ den Wert 1 an, spricht dies für einen perfekten linearen Zusammenhang, $|r| = 0$ bedeutet, dass kein linearer Zusammenhang zwischen den beiden Messgrößen besteht.

Korrelationskoeffizient r	
0	kein linearer Zusammenhang
0 bis 0,5	schwacher linearer Zusammenhang
0,5 bis 0,8	mittlerer linearer Zusammenhang
0,8 bis 1,0	starker linearer Zusammenhang
1	perfekter linearer Zusammenhang

Tabelle 5: Bedeutung des Korrelationskoeffizienten r

Zudem wurde das Quadrat des Korrelationskoeffizienten errechnet, welches auch als Bestimmtheitsmaß ($R^2 = \text{Determinationskoeffizient}$) bezeichnet wird. Dieses beschreibt den Anteil der Wertestreuung, die sich in beiden zu untersuchenden Variablen wieder finden lässt. Er errechnet sich wie folgt:

$$R^2 = \frac{s_{xy}^2}{s_x^2 s_y^2} \quad [10]$$

$R^2 = \text{Bestimmtheitsmaß}$

$s_{xy} = \text{Kovarianz}$

$s_x = \text{Einzelvarianz zu Merkmal x}$

$s_y = \text{Einzelvarianz zu Merkmal y}$

Formel 10: Errechnung des Bestimmtheitsmaßes

Wenn der Betrag des Korrelationskoeffizienten und damit auch das Bestimmtheitsmaß Werte nahe 1 erreichen, spricht dies für eine hohe Qualität der linearen Approximation, von einem linearen Zusammenhang ist auszugehen. Dies lässt sich jedoch nur bei gleichzeitiger Begutachtung des Scatterplots nachvollziehen.

Die Wahrscheinlichkeit eines linearen Zusammenhanges kann mit einem t-Test verifiziert werden. Hierbei gilt Formel 11, welche es erlaubt, die Signifikanz des Korrelationskoeffizienten zu errechnen.

$$t = \frac{r \times \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad [11]$$

mit n-2 Freiheitsgraden

Formel 11: t-Wert eines linearen Zusammenhangs

Die Berechnung der Signifikanz des Korrelationskoeffizienten wurde nur für die Korrelation der nach Layern aufgesplitteten Gegenüberstellung von GWA und ADC durchgeführt. Da für diese Korrelation nur 23 Patellae zur Verfügung standen, wäre die Power des Tests für die gesamte Patelladicke mit n=23 und 2 Variablen (jeweils die einander entsprechenden Mittelwerte der GWA und des ADC) bei 21 Freiheitsgraden recht gering.

Durch Aufteilung der Patellae in je 2 Layer konnte wenigstens ein n=46 mit 44 Freiheitsgraden gewährleistet werden. Die Anzahl der betrachteten Wertepaare verdoppelt sich in diesem Fall, indem aus einer Patellaprobe jeweils ein Wertepaar für die oberflächennahe Knorpelhälfte und für die knochennahe Knorpelhälfte generiert wird.

5. Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Diffusions-Tensor-MRT und der anatomischen Aufarbeitung dargestellt.

Es folgen eine Gegenüberstellung aller Messungen, ein Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Patellae sowie der Unterschiede in Abhängigkeit des Alters.

5.1 Ergebnisse der ADC-Bestimmung im hyalinen Gelenkknorpel

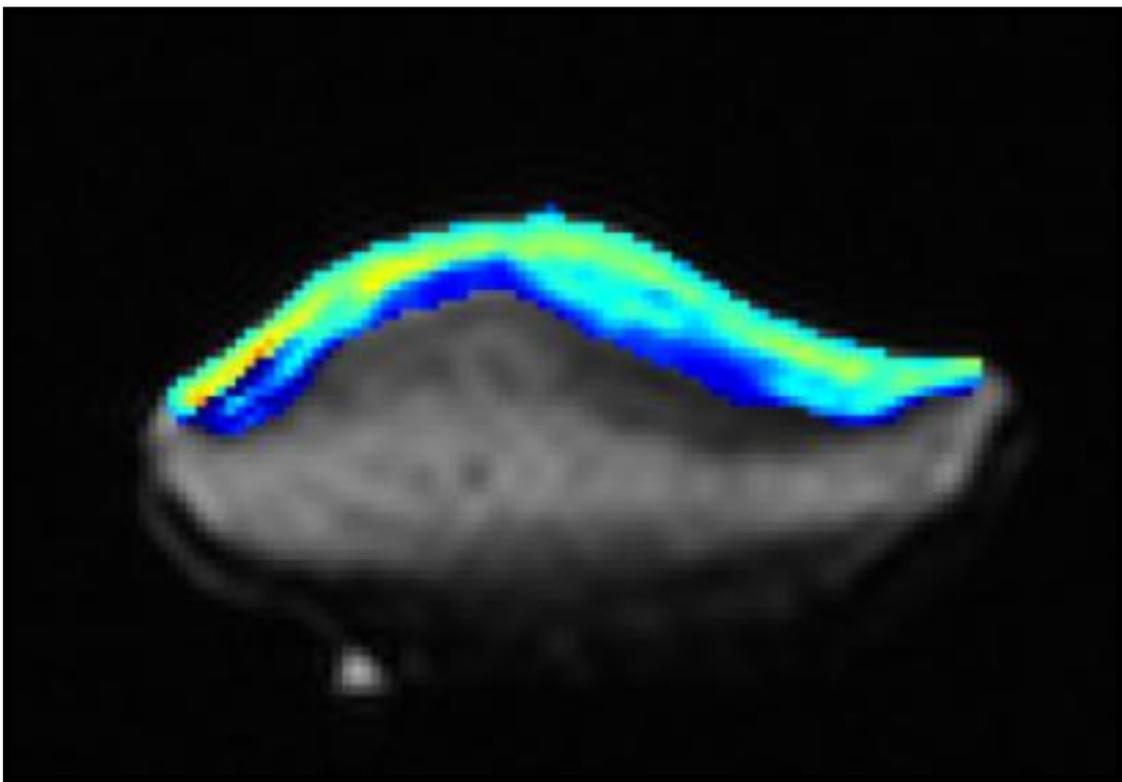


Abbildung 13: ADC-Map, Patella 15, slice 12

Wie man der Regressionsgeraden aus Abbildung 14 entnehmen kann, zeigt sich mit zunehmendem Alter eine fallende Tendenz bezüglich der mittleren ADC-Werte.

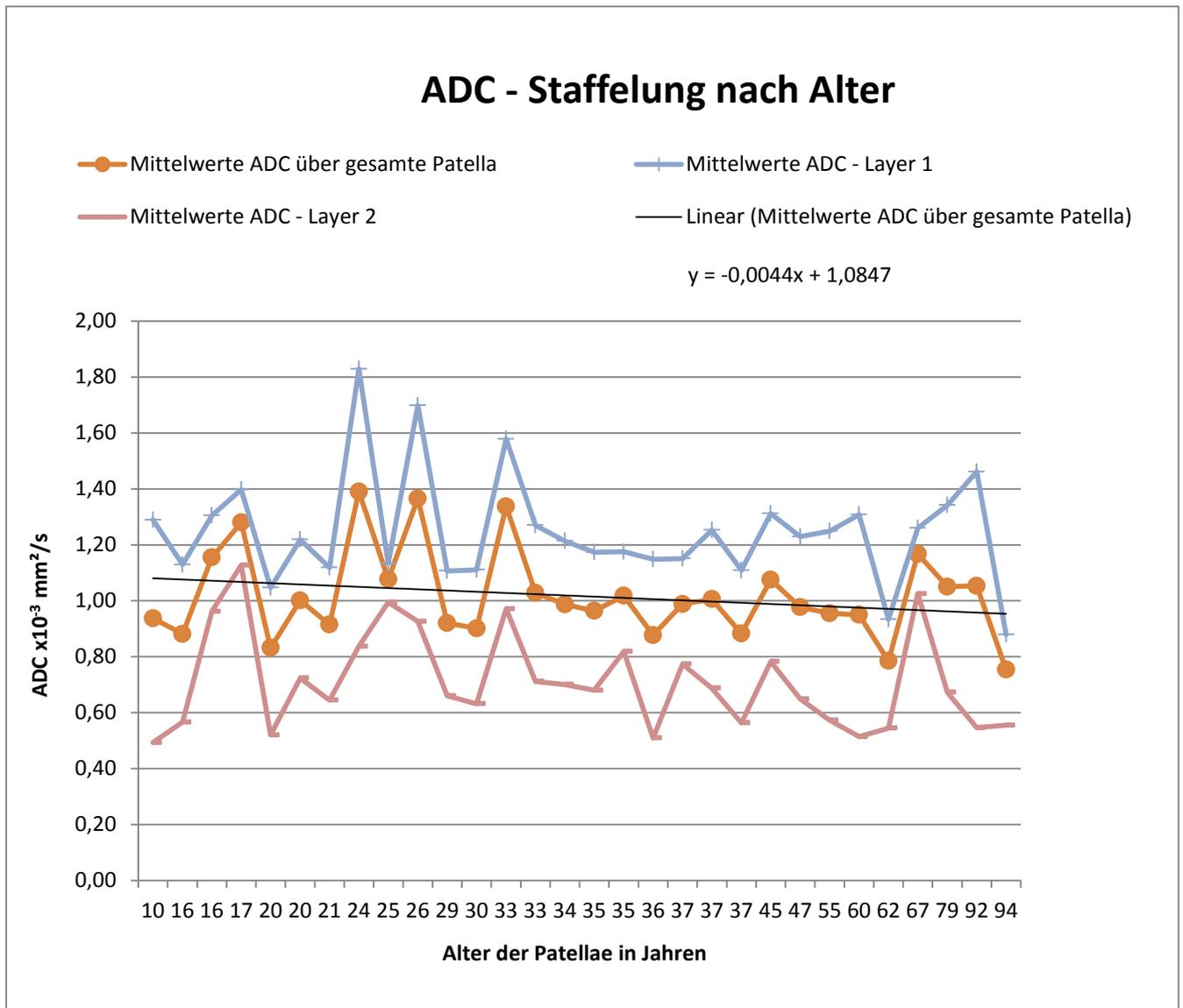


Abbildung 14: Staffelung der ADC nach dem Alter; $R^2=0,054$; $r=0,24$; $p=0,21$

Die höchsten ADC-Werte in Layer1 und Layer 2 erreichte Patella 36 (weiblich, 24 Jahre) mit $1,83 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ in Layer 1. Den niedrigsten Mittelwert zeigte die älteste Patella, Nr. 25 (weiblich, 94 Jahre) mit $0,75 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$. Anhand der Linear Fit-Geraden kann ein durchschnittliches Abfallen der ADC um $0,0044 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ pro Jahr abgeleitet werden. Es zeigt sich bei einem Korrelationskoeffizienten von 0,24 ($R^2=0,054$) eine schwache lineare Korrelation ($p=0,21$).

ADC - nach Alter sortiert			
Pat	Alter (Jahre)	ADC ($\times 10^{-3}$ mm ² /s)	STABW $\times 10^{-3}$ mm ² /s
54	10	0,94	0,46
15	16	0,88	0,40
43	16	1,15	0,48
27	17	1,28	0,28
38	20	0,83	0,38
48	20	1,00	0,41
45	21	0,91	0,43
36	24	1,39	0,82
24	25	1,08	0,31
18	26	1,37	0,62
37	29	0,92	0,35
26	30	0,90	0,41
23	33	1,34	0,44
34	33	1,03	0,41
47	34	0,99	0,37
40	35	0,96	0,51
49	35	1,02	0,30
33	36	0,88	0,43
16	37	0,99	0,35
39	37	1,01	0,40
46	37	0,88	0,46
57	45	1,08	0,42
51	47	0,98	0,41
55	55	0,96	0,42
56	60	0,95	0,50
20	62	0,78	0,36
19	67	1,17	0,32
52	79	1,05	0,46
28	92	1,05	0,55
25	94	0,75	0,47

Tabelle 6: Übersicht über die ADC-Ergebnisse aller Patellae, nach Alter aufsteigend sortiert

Allen Messungen gleich ist die Tatsache, dass ein hoher ADC-Wert in Layer 1 immer einen noch höheren Layer 2-Wert mit sich bringt.

Im Mittel über alle eingeschlossenen Patellae liegt der ADC in Layer 1 bei $1,25 \times 10^{-3}$ mm²/s bei einer Standardabweichung (STABW) von lediglich $0,20 \times 10^{-3}$ mm²/s. In Layer 2 nimmt der ADC den Wert von $0,71 \times 10^{-3}$ mm²/s ein (STABW: $0,18 \times 10^{-3}$ mm²/s) an. Somit lässt sich bei einem p-Wert von unter 0,00001 ableiten, dass der ADC an der Knorpeloberfläche hoch signifikant größer ist, als in den tiefen Knorpelregionen. (s. Tabelle 7).

ADC – alle Patellae	Mittelwert ($\times 10^{-3}$ mm ² /s)	STABW	95%-KI	p-Wert
ADC - gesamt	1,02	0,16	0,96 1,08	
ADC - Layer 1	1,25	0,20	1,18 1,32	<0,00001
ADC - Layer 2	0,71	0,18	0,64 0,78	

Tabelle 7: Übersicht über die ADC im gesamten Knorpel, Layer 1 und Layer 2. Mittelwert, Standardabweichung, 95%-Konfidenzintervall und p-Wert werden angegeben.

Die niedrigeren Werte in Layer 2 werden nochmal im Diagramm (s. Abbildung 15) für beide Gruppen einzeln verdeutlicht.

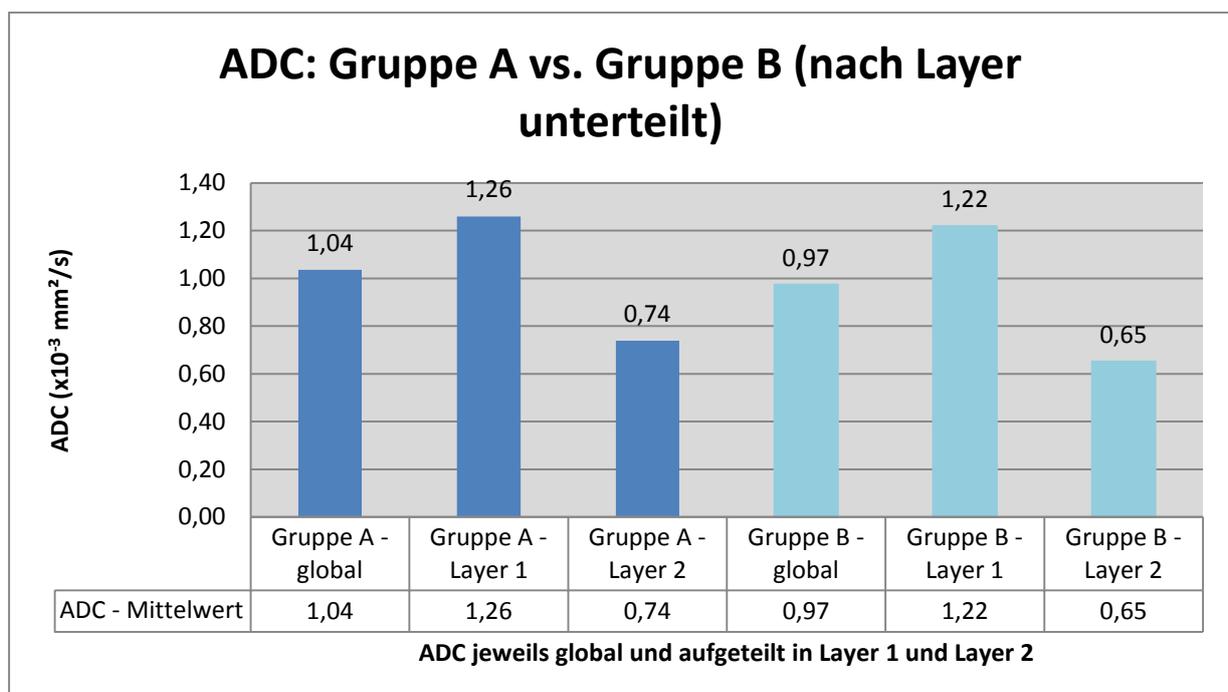


Abbildung 15: Mittelwerte der ADC im gesamten Knorpel, Layer 1 und Layer 2. Jeweils für Gruppe A und Gruppe B

5.1.1 Verhalten der ADC in jungem (Gruppe A) und gealtertem (Gruppe B) Gelenkknorpel

Wie man Tabelle 8 entnehmen kann, ist der mittlere ADC in Gruppe B tendenziell niedriger als in der jüngeren Gruppe, jedoch lässt sich bei einem p-Wert von 0,31 keine Signifikanz nachweisen. Hier stehen $1,04 \pm 0,17 \times 10^{-3}$ mm²/s (Gruppe A) einem Wert von $0,97 \pm 0,14 \times 10^{-3}$ mm²/s (Gruppe B) gegenüber. Die in Gruppe B niedrigeren Mittelwerte zeigen sich in Layer 1 ($1,26 \times 10^{-3}$ mm²/s auf $1,22 \times 10^{-3}$ mm²/s) weniger ausgeprägt als in Layer 2 ($0,74 \times 10^{-3}$ mm²/s auf $0,60 \times 10^{-3}$ mm²/s) (s. Tabelle 15).

ADC A-B	Mittelwert (in $\times 10^{-3}$ mm ² /s)	STABW	95%-KI	p-Wert
Gruppe A	1,04	0,17	0,96 1,12	0,31
Gruppe B	0,97	0,14	0,86 1,08	

Tabelle 8: ADC in Gruppe A und Gruppe B. Mittelwerte, Standardabweichungen, 95%-Konfidenzintervall und p-Wert

Auch zeigt sich im Vergleich von Gruppe A und Gruppe B ein vor allem lateralbetontes Abfallen der mittleren ADC-Werte. Während die absolute Reduktion des ADC im Bereich der medialen Facette nur $0,003 \times 10^{-3}$ mm²/s (entspricht 0,3%) beträgt, findet sich im Bereich der lateralen Facette ein Defizit von $0,12 \times 10^{-3}$ mm²/s (entspricht 11,2%) (siehe Abbildung 16).

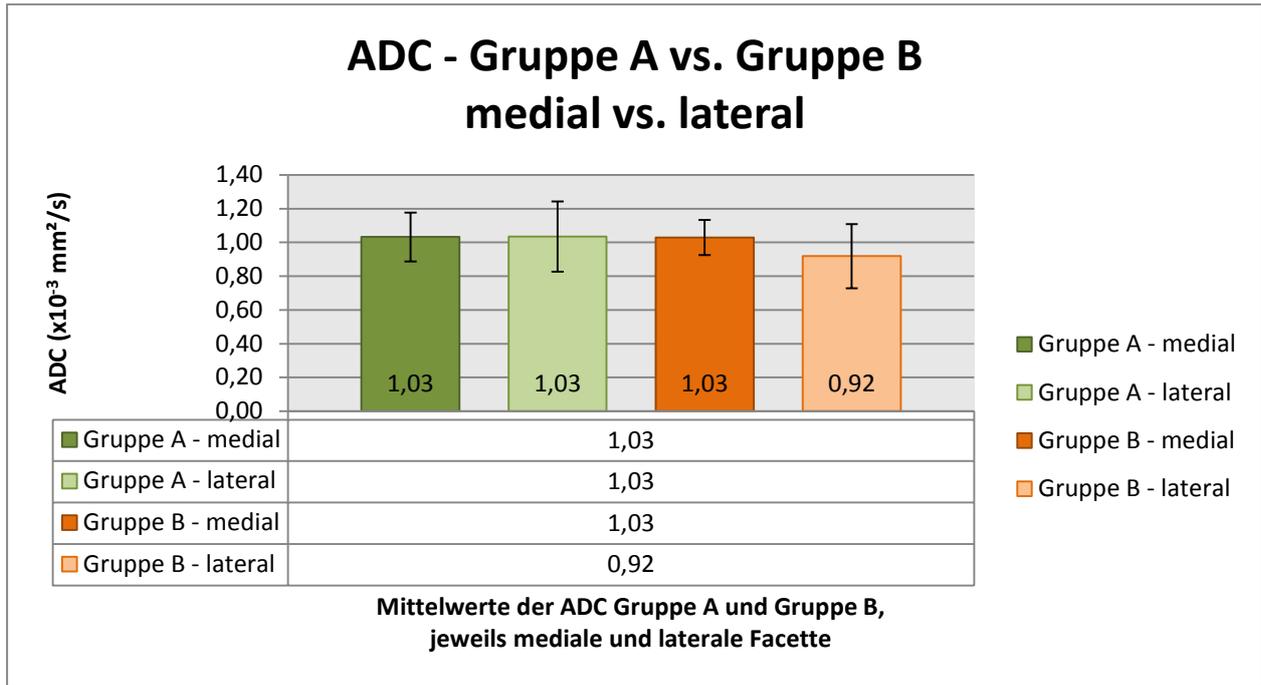


Abbildung 16: ADC in Gruppe A und Gruppe B, nach Facetten unterteilt

Bei p-Werten von 0,95 (mediale Facette) und 0,16 (laterale Facette) ist hier lediglich eine Tendenz für facettenbetonte abfallende ADC-Werte zu sehen, eine Signifikanz lässt sich nicht nachweisen. Ebenso verhält sich das altersbedingte Abfallen der ADC-Werte in Abhängigkeit der Layer: bei p-Werten von 0,61 für Layer 1 und 0,21 für Layer 2 kann hier nicht von Signifikanz gesprochen werden

5.1.2 Verhalten des Apparent Diffusion Coefficient in Abhängigkeit des Geschlechts

Zwischen den männlichen und weiblichen Proben zeigt sich deutlich ein nicht signifikanter Unterschied ($p=0,75$) bezüglich der mittleren ADC-Werte. Die weiblichen Proben erreichen einen Mittelwert von $1,04 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ und liegen damit nur minimal unter dem Mittelwert der männlichen Proben ($1,01 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$) (siehe Tabelle 9).

ADC männlich - weiblich	Mittelwert (in $\times 10^{-3}$ mm ² /s)	STABW	95%-KI	p-Wert
männlich	1,01	0,14	0,95 1,07	0,75
weiblich	1,04	0,22	0,85 1,23	

Tabelle 9: ADC in männlichen und weiblichen Patellae; Mittelwert, Standardabweichung, 95%-Konfidenzintervall und p-Wert

Die folgende Tabelle schlüsselt das Verhalten der ADC-Werte zwischen männlichen und weiblichen Patellae weiter auf. Man sieht, dass nur geringe Unterschiede hinsichtlich der ADC in der medialen oder lateralen Facette sowie in Layer 1 und Layer 2 zwischen den Geschlechtern existieren.

Hierbei weisen die weiblichen Patellae nicht signifikant erhöhte Werte in der medialen und lateralen Facette als auch in Layer 1 auf. Lediglich in Layer 2 sind die ADC-Werte der männlichen Patellae mit $0,72 \times 10^{-3}$ mm²/s nicht signifikant über den ADC- Werten der weiblichen Patellae ($0,69 \times 10^{-3}$ mm²/s).

ADC (in $\times 10^{-3}$ mm ² /s) - Sektorenanalyse männlich-weiblich			
	<i>männlich</i>	<i>weiblich</i>	p-Wert
medial	1,02	1,06	0,50
lateral	0,95	1,02	0,87
Layer 1	1,23	1,31	0,51
Layer 2	0,72	0,69	0,59
Anzahl	22	8	

Tabelle 10: ADC - Sektorenanalyse der männlichen und weiblichen Patellae

Die Tatsache, dass in Anbetracht des ADC, kaum Unterschiede zwischen der weiblichen und der männlichen Gruppe bestehen, wird durch die hohen p-Werte (zwischen $0,50 \times 10^{-3}$ mm²/s für die mediale Facette und $0,87 \times 10^{-3}$ mm²/s für die laterale Facette) unterstrichen (s. Tabelle 10).

5.2 Ergebnisse der Fractional Anisotropy

Neben dem in Kapitel 5.1 besprochenen Apparent Diffusion Coefficient wurde aus den DTI-Datensätzen zusätzlich die Fraktionelle Anisotropie (FA) errechnet. Im Folgenden werden die Veränderungen der FA mit zunehmendem Alter dargestellt und die FA-Werte der weiblichen und männlichen Proben gegenübergestellt.

Staffelt man die FA der eingeschlossenen Patellae nach ihrem Sterbealter, fällt auf, dass mit zunehmendem Alter eine gewisse Reduktion der FA eintritt. Abbildung 18 zufolge nimmt die über den gesamten Knorpel gemittelte FA pro Jahr um etwa 0,0004 Punkte ab.

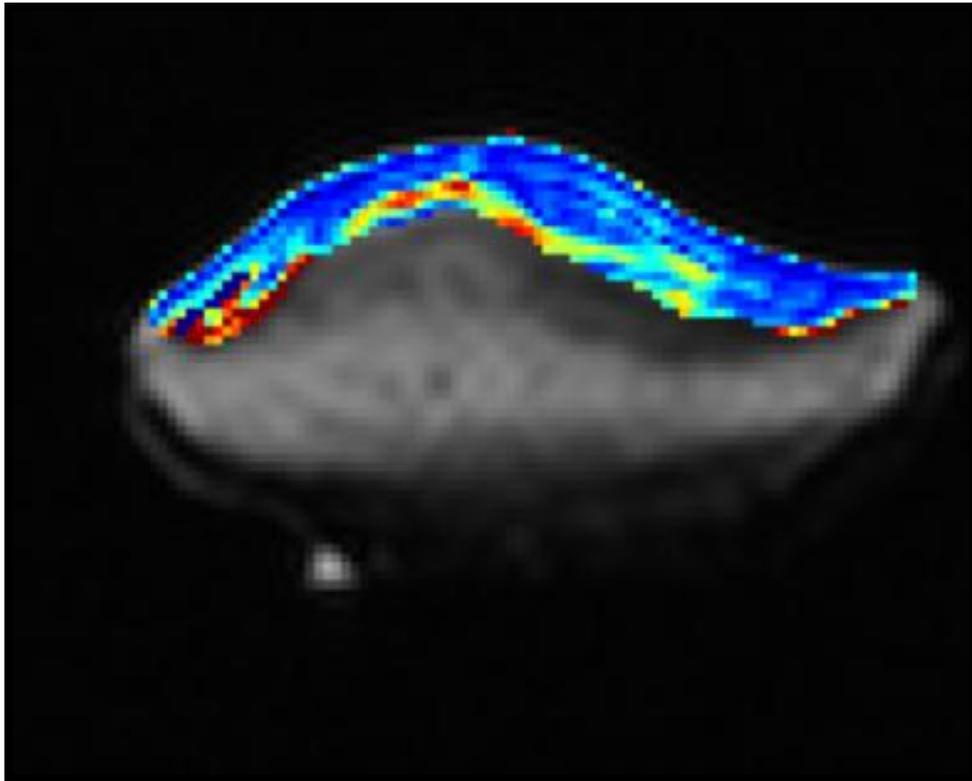


Abbildung 17: FA-Map Patella 15, slice 12

FA – nach Alter sortiert						
Patella- Nummer	Geschlecht	Alter (in Jahren)	gesamt	Layer 1	Layer 2	Standardabweichung
54	männlich	10	0,434	0,321	0,577	0,230
15	männlich	16	0,340	0,309	0,379	0,250
43	männlich	16	0,338	0,253	0,446	0,197
27	männlich	17	0,251	0,212	0,302	0,159
38	männlich	20	0,549	0,566	0,526	0,222
48	männlich	20	0,309	0,232	0,407	0,257
45	männlich	21	0,343	0,244	0,475	0,255
36	weiblich	24	0,494	0,437	0,567	0,227
24	männlich	25	0,400	0,391	0,413	0,204
18	weiblich	26	0,540	0,536	0,545	0,252
37	weiblich	29	0,368	0,435	0,276	0,246
26	männlich	30	0,422	0,387	0,469	0,234
23	männlich	33	0,663	0,708	0,595	0,250
34	männlich	33	0,355	0,309	0,417	0,233
47	männlich	34	0,296	0,268	0,331	0,178
40	männlich	35	0,344	0,259	0,459	0,184
49	männlich	35	0,282	0,229	0,349	0,266
33	männlich	36	0,437	0,446	0,425	0,258
16	weiblich	37	0,266	0,246	0,292	0,310
39	männlich	37	0,336	0,271	0,421	0,232
46	männlich	37	0,482	0,433	0,551	0,165
57	männlich	45	0,306	0,228	0,403	0,216
51	weiblich	47	0,403	0,314	0,519	0,259
55	weiblich	55	0,308	0,285	0,338	0,201
56	weiblich	60	0,344	0,289	0,410	0,243
20	männlich	62	0,499	0,554	0,412	0,251
19	männlich	67	0,229	0,221	0,242	0,149
52	männlich	79	0,369	0,300	0,458	0,260
28	männlich	92	0,382	0,294	0,491	0,220
25	weiblich	94	0,564	0,603	0,503	0,247

Tabelle 11: Übersicht über die FA-Werte aller Patellae, nach Alter aufsteigend sortiert

Den höchsten Mittelwert erreicht hierbei Patella 23 (männlich, 33 Jahre) mit 0,663 über beide Layer. Der niedrigste Mittelwert lässt sich bei Patella 19 (männlich, 67 Jahre) errechnen, die FA beträgt hier nur 0,229 (siehe Tabelle 11). Eine weiterer Ausreißer nach oben ist Patella 38 (männlich, 20 Jahre), welche mit einem Mittelwert von 0,549 ebenso den Durchschnitt in der Gruppe der unter 45-jährigen erhöht.

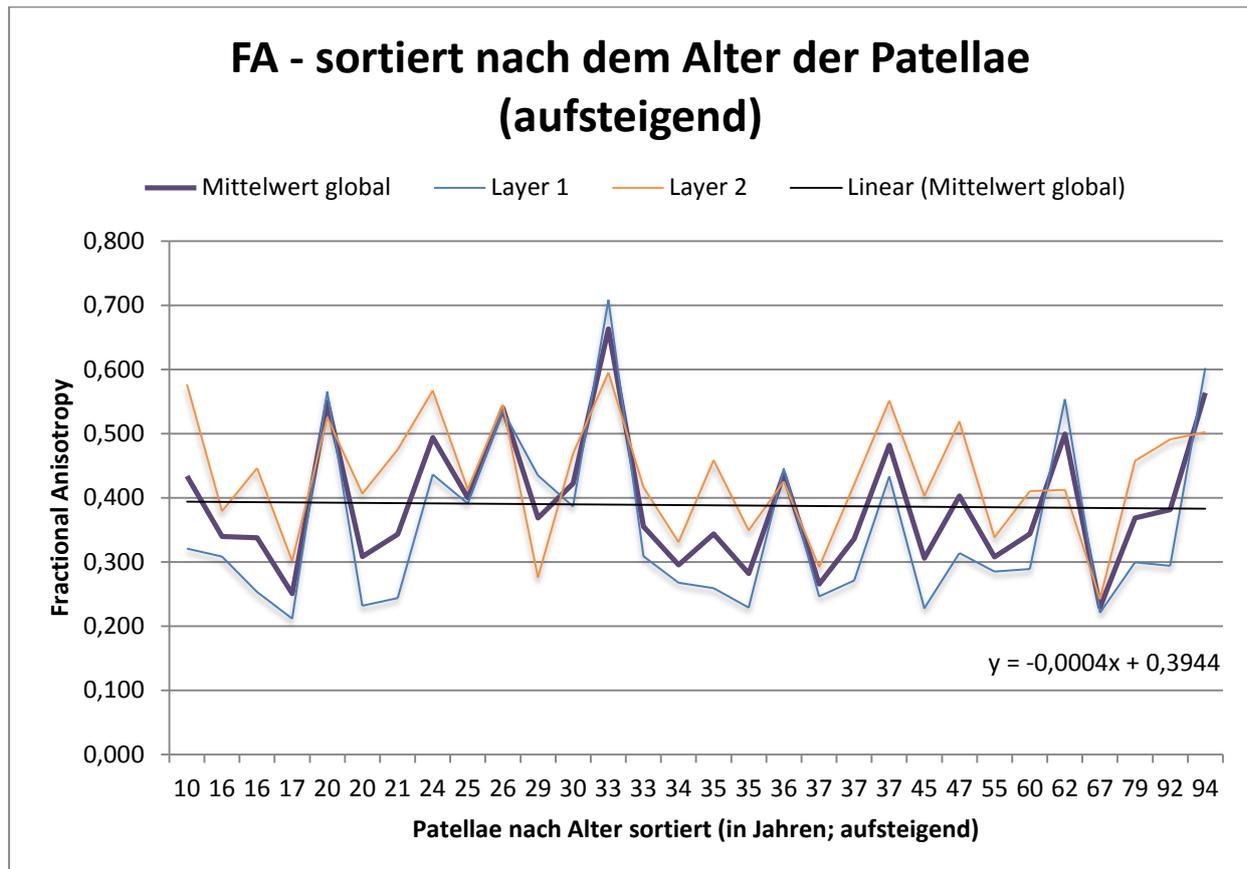


Abbildung 18: FA aller Patellae, nach dem Alter aufsteigend sortiert; $R^2=0,001$; $r=0,033$; $p=0,86$

In den meisten Fällen liegen die Werte aus Layer 1 deutlich unterhalb der Mittelwerte von Layer 2. Ausnahmen bilden hierbei die Messungen der Patellae 20, 25, 33, 34, 37, 38. Es handelt sich hierbei um insgesamt vier männliche Proben, zwei weibliche, das Sterbealter reicht von 20 bis 94 Jahren.

FA - Mittelwert alle Patellae				
	Mittelwert	STABW	95%-KI	p-Wert (Layer)
global	0,388	0,103	0,350 0,426	
Layer 1	0,353	0,131	0,304 0,402	0,008
Layer 2	0,433	0,093	0,398 0,468	

Tabelle 12: FA - gesamte Patellae, Layer 1 und Layer 2; jeweils Mittelwert, Standardabweichung, 95%-Konfidenzintervall und p-Wert

Wie man Tabelle 12 entnehmen kann, liegt die mittlere FA in Layer 1 mit $0,353 \pm 0,131$ unterhalb des Mittelwerts in Layer 2 ($0,433 \pm 0,093$), was die Beobachtungen aus Abbildung 18 bestätigt. Der Unterschied der Fraktionellen Anisotropie zwischen den beiden Layern ist mit einem p-Wert von 0,008 sehr signifikant.

Über alle Patellae lässt sich eine mittlere FA von 0,388 mit einer Standardabweichung von 0,103 errechnen.

5.2.1 Veränderung der Fractional Anisotropy mit zunehmendem Alter

Wie Abbildung 18 schon vermuten lässt, zeigt sich bei einem Korrelationskoeffizienten von 0,033 ($R^2=0,001$) eine schwache, nicht signifikante ($p=0,86$) Verringerung der FA mit zunehmendem Alter. Für Gruppe A lässt sich ein Mittelwert von $0,393 \pm 0,106$ errechnen, Gruppe B liegt bei lediglich $0,378 \pm 0,102$. Hierbei lässt sich bei einem p von 0,72 kein signifikanter Unterschied feststellen. Die abfallende Tendenz zeigt sich in beiden Layern, ist jedoch in Layer 1 ($p=0,80$) als auch in Layer 2 ($p=0,60$) deutlich nicht signifikant (siehe Abbildung 19).

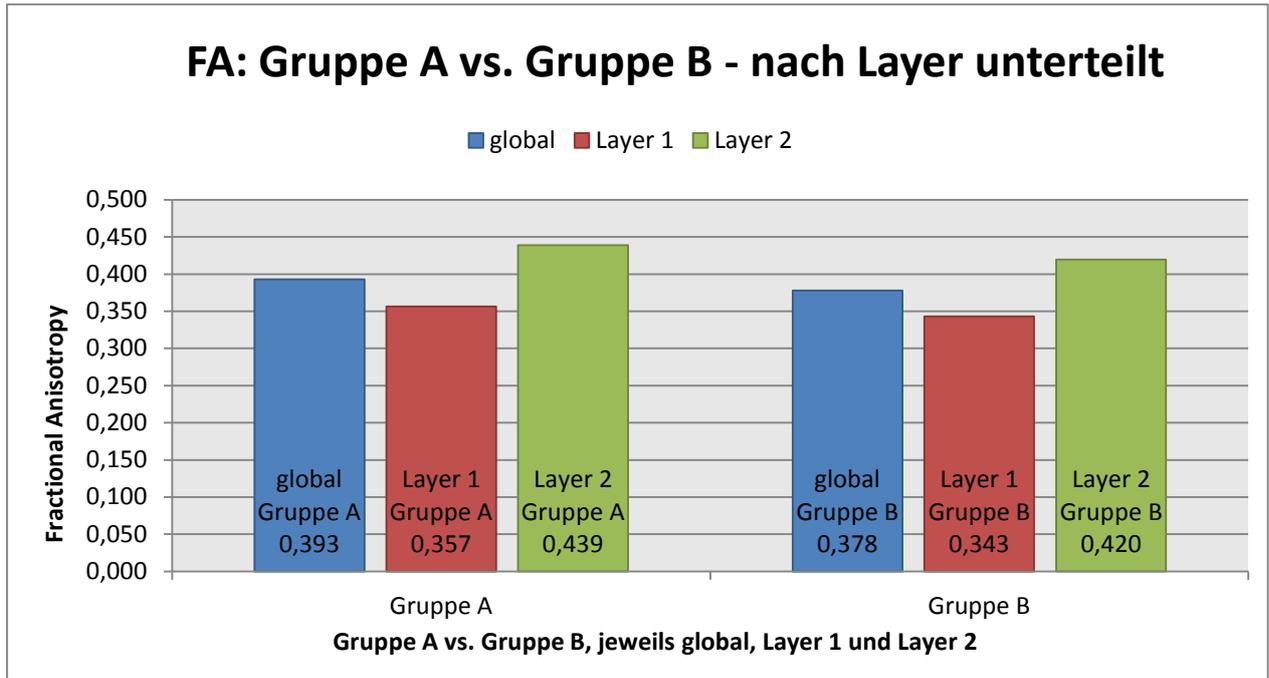


Abbildung 19: FA in Gruppe A und B; gesamt, Layer 1 und Layer 2

Während sich im Bereich der medialen Facette eine Verringerung um 7,8% errechnen lässt, zeigt sich lateral sogar ein Anstieg in Gruppe B um 0,5% (siehe Abbildung 20). Bei einem p von 0,51 für die mediale und 0,96 für die laterale Facette sind sowohl die mediale Verringerung als auch der laterale Anstieg der FA allenfalls als nicht signifikante Tendenzen zu sehen.

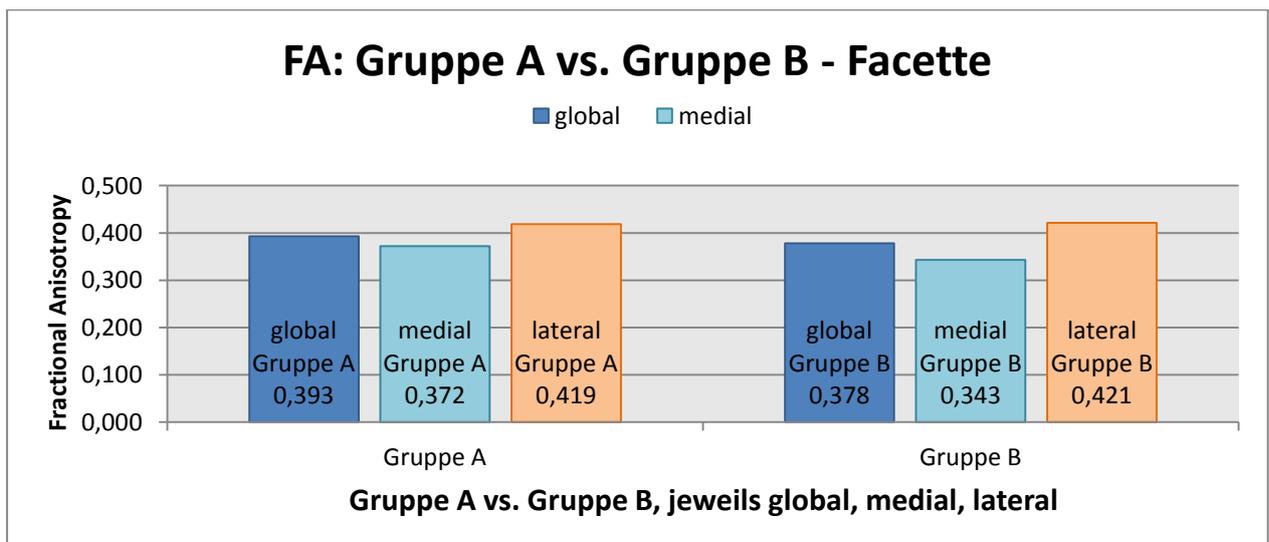


Abbildung 20: FA in Gruppe A und B; gesamt, Layer 1 und Layer 2

5.2.2 Unterschiede in der FA in Abhängigkeit des Geschlechts

Die durchschnittliche FA in männlichen Proben ist mit $0,380 \pm 0,102$ leicht unterhalb derer, die bei weiblichen Proben erreicht werden ($0,411 \pm 0,110$). Tabelle 13 kann man entnehmen, dass der FA-Wert bei Frauen nahe der Oberfläche höher ist (männlich: 0,338 zu weiblich: 0,393), während in Layer 2 der Wert der männlichen Proben mit 0,434 zu 0,431 sogar leicht über dem Wert der weiblichen Proben liegt. Weder in Bezug zur Facette noch zu den Layers zeigt sich hier ein signifikanter Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Proben.

FA - Sektorenanalyse männlich-weiblich			
	<i>männlich</i>	<i>weiblich</i>	p-Wert
medial	0,363	0,366	0,943
lateral	0,404	0,463	0,247
Layer 1	0,338	0,393	0,325
Layer 2	0,434	0,431	0,954
global	0,380	0,411	0,507
Anzahl	22	8	

Tabelle 13: FA - Sektorenanalyse der männlichen und weiblichen Patellae

5.3 Auswertung der Grauwertanalyse

Wie bereits in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben, wurden im Rahmen der Grauwert-Analyse neun Sub-ROIs von der Gelenkoberfläche bis hin zur Knorpel-Knochen-Grenze bestimmt und hieraus 2 Layer errechnet. In Analogie zur DTI liegt auch hier Layer 1 an der Knorpeloberfläche und ergibt sich aus dem Mittelwert der Grauwerte in Feld 1 bis 4. Layer 2 wird durch Errechnung der Mittelwerte aus Feld 5 bis 9 errechnet und beschreibt die tiefen Knorpelregionen bis hin zum Tide Mark. Um später mit den Ergebnissen der Magnetresonanztomographie vergleichen zu können, fließen nur diejenigen Patellae in die weitere Auswertung ein, von denen auch ein MRT-Datensatz vorliegt.

Insgesamt wurden aus 28 verschiedenen Patellae 60 Knorpel-Knochenzylinder für die histologische Aufarbeitung gewonnen. Um eine bessere Korrelation mit der DTI gewährleisten zu können, werden in der weiteren Auswertung nur diejenigen Patellae mit eingebracht, von denen auch DTI-Daten akquiriert werden konnten. Somit wurden insgesamt 110 histologische Schnitte betrachtet, wovon 50 Stück aus medialen Facetten, 60 Stück aus lateralen Facetten gewonnen wurden. 85 Schnitte werden Gruppe A zugeordnet, wohingegen Gruppe B auf 25 Schnitte zurückgreift. Zudem waren 85 Schnitte aus männlichen Patellae, 25 Stück aus weiblichen.

Die 23 untersuchten Patellae weisen in der Gesamtheit ein Durchschnittsalter von 39,9 Jahren (STABW 20,9 Jahre) auf. Sie setzen sich zusammen aus 16 männlichen (Durchschnittsalter 39,9 Jahre; STABW 23,6 Jahre) und sieben weiblichen Patellae (Durchschnittsalter 39,7 Jahre; STABW 14,5 Jahre). 15 Patellae wurden aufgrund des Sterbealters vor dem 45. Lebensjahr, Gruppe A zugeordnet, die restlichen acht Patellae bilden Gruppe B.

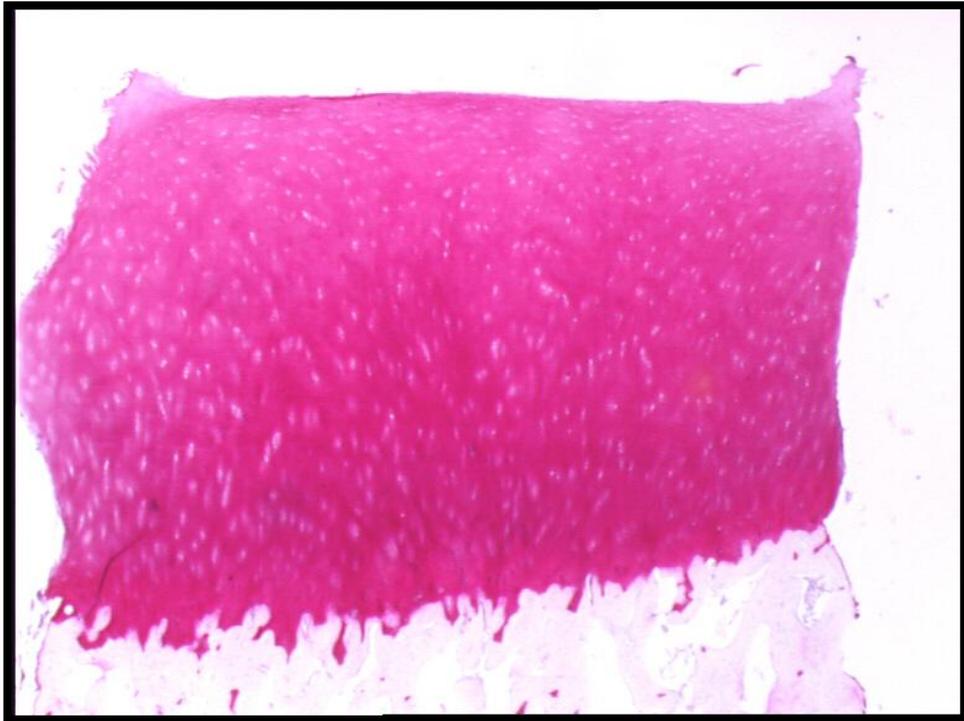


Abbildung 21: Patella 44, laterale Facette, Safranin-O-Färbung, Vergrößerung: 16x6,25; Gruppe A

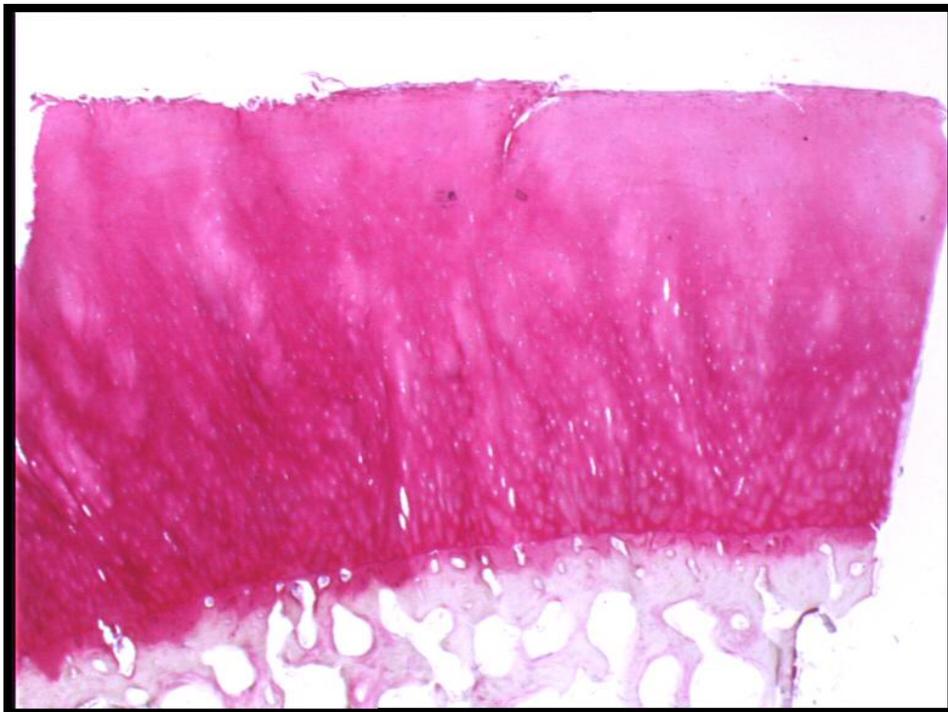


Abbildung 22: Patella 51, mediale Facette, Safranin-O-Färbung, Vergrößerung: 16x6,25, Gruppe B. Es zeigen sich bereits an der Knorpeloberfläche geringere Anfärbungen mit Safranin-O, als in Gruppe A.

5.3.1 GWA in Layer 1 und Layer 2

Der mittlere Grauwert über alle Patellae liegt bei 163,0 mit einer Standardabweichung von 29,2 (entspricht 17,9%). Hierbei ist bei einem $p < 0,01$ der Mittelwert der oberflächlichen Knorpelregionen mit 180,6 (STABW 17,6%) deutlich signifikant höher, als in Layer 2 (149,0; STABW 19,4%) (Abbildung 23). Höhere Grauwerte bedeuten einen niedrigeren Safranin-O-Gehalt.

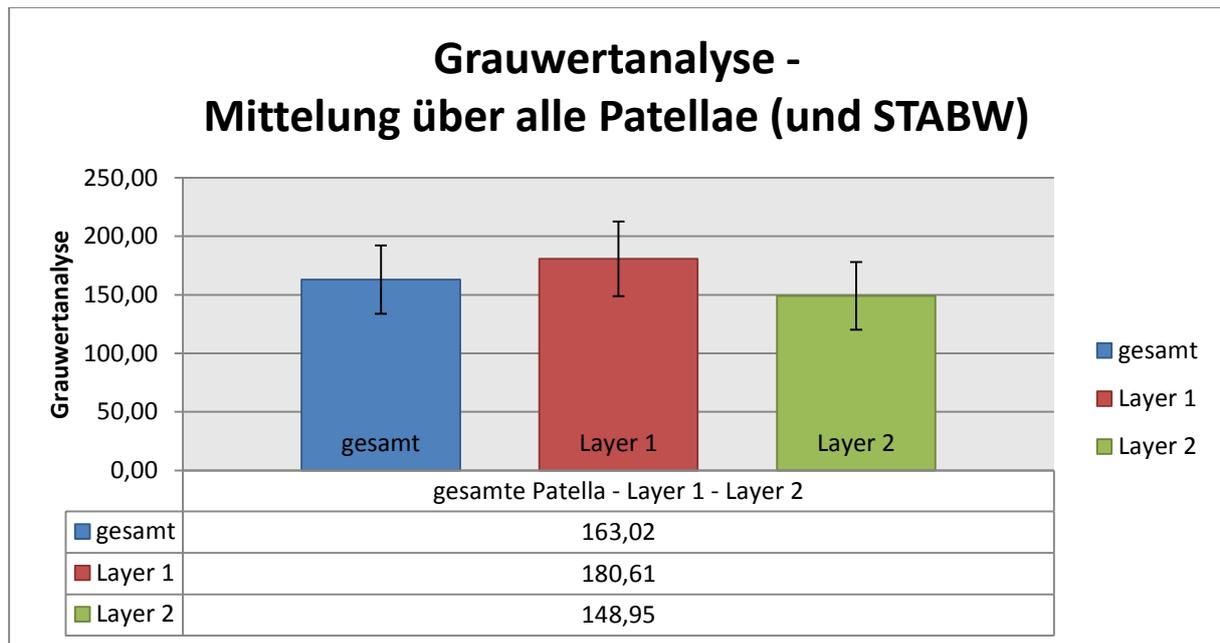


Abbildung 23: GWA - gesamte Knorpeldicke, Layer 1, Layer 2

Dies wird verdeutlicht in Abbildung 24, hier liegen bei jeder einzelnen Probe die Layer 1-Werte über den Layer 2-Werten. Hieraus lässt sich ein höherer Proteoglykangehalt in den tieferen Knorpelregionen ableiten.

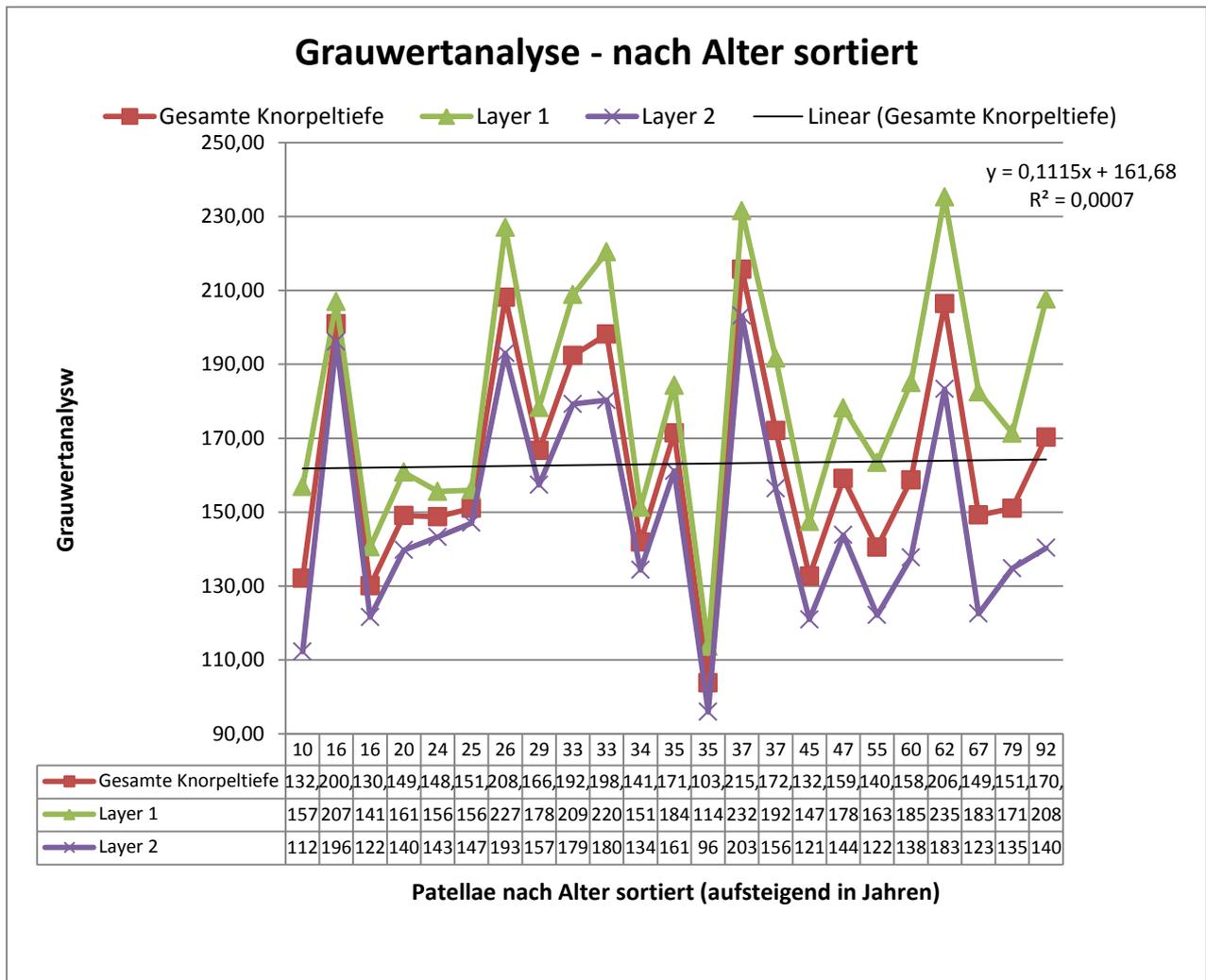


Abbildung 24: GWA - alle Patellae nach Alter aufsteigend sortiert; R²=0,0007; r=0,026; p=0,90

Abbildung 25 und 26 schlüsseln diese Tendenz noch weiter auf. Wir sehen in nahezu allen Patellae einen abfallenden Grauwert von Feld 1 (Gelenkfläche) bis zu Feld 8, gefolgt von einem erneuten, dezenten Anstieg in Feld 9, was ebenso für einen Anstieg des Proteoglykangehalts von der Gelenkfläche bis hin zum Tidemark spricht. Betrachtet man Abbildung 25, bemerkt man den nahezu parallelen Verlauf der einzelnen Kurven. Hier geht ein hoher Grauwert in Feld 1 weitestgehend immer mit einem hohen Grauwert in Feld 9 einher.

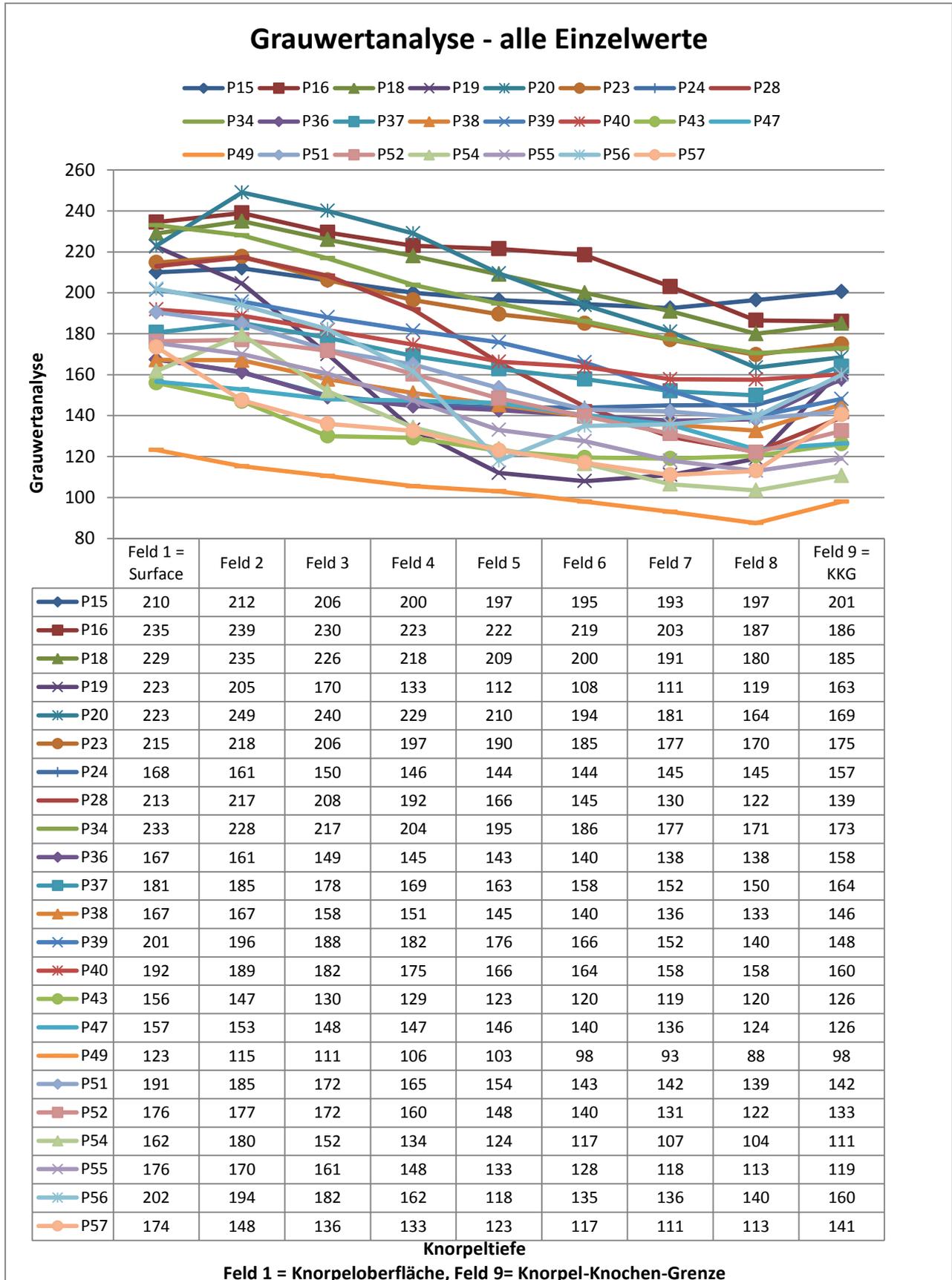


Abbildung 25: GWA - alle Patellae; Übersicht über die einzelnen Felder

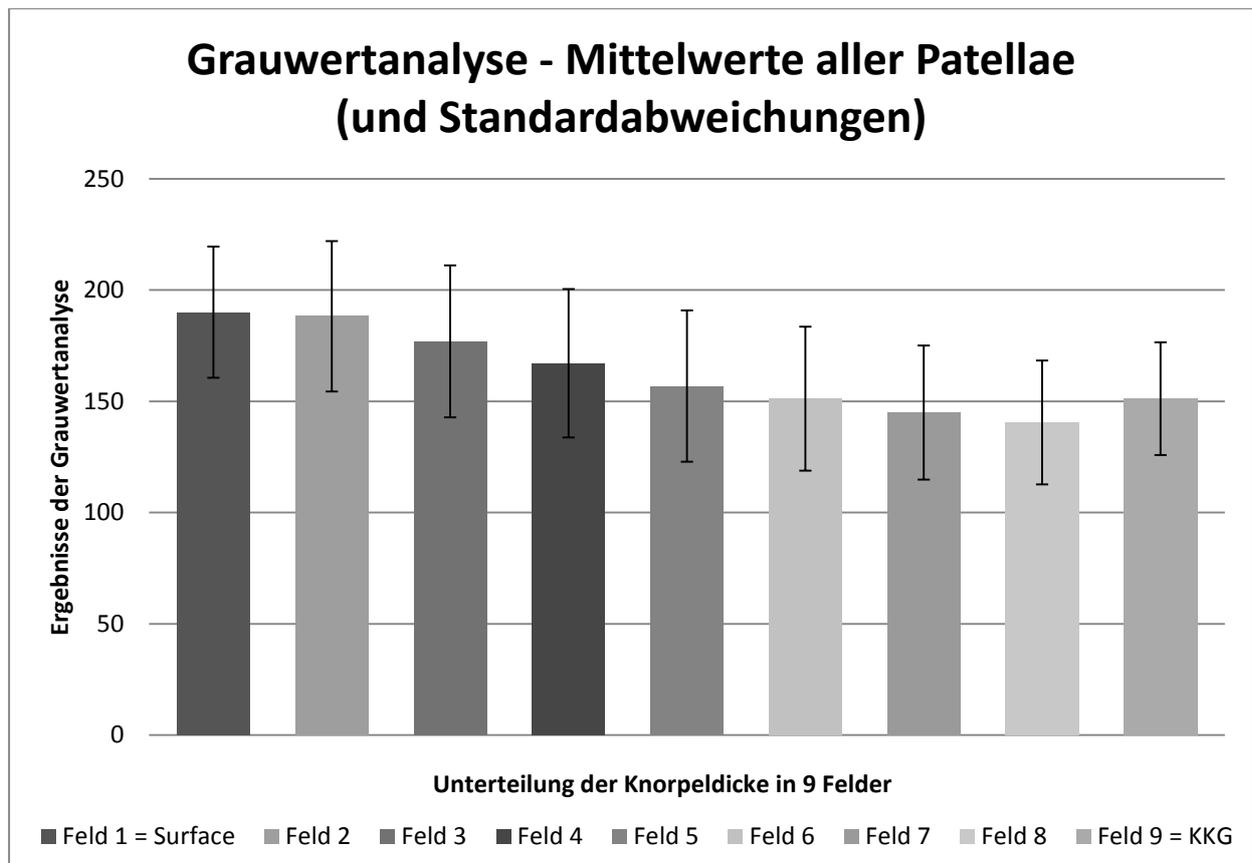


Abbildung 26: GWA - Mittelwerte der einzelnen Felder über alle Proben

5.3.2 GWA in Gruppe A und Gruppe B

Die mittleren Grauwerte sind in Gruppe A mit $165,5 \pm 32,7$ nur in geringem Maße und nicht signifikant ($p=0,55$) höher als die Mittelwerte in Gruppe B ($158,5 \pm 22,6$). Gruppe B zeigt hierbei eine größere Divergenz zwischen Layer 1 und Layer 2, wohingegen Gruppe A ein homogeneres Bild darstellt (siehe Tabelle 14). Layer 1 liegt in Gruppe A mit 178,9 leicht unter dem Wert in Gruppe B (183,8), dafür ist der mittlere Grauwert in Layer 2 deutlich über dem der Patellae in Gruppe B (154,7 zu 138,2). Weder in den Mittelwerten über die gesamte Knorpeldicke noch im Vergleich der einzelnen Layers, zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen Gruppe A und Gruppe B.

GWA – A vs. B	Mittelwert	STABW	95%-KI	P-Wert (A-B)
Gruppe A	165,46	32,70	147,35 183,57	0,55
Layer 1	178,90	34,91	159,57 198,23	0,71
Layer 2	154,71	31,65	137,18 172,24	0,14
Gruppe B	158,46	22,58	139,59 177,33	
Layer 1	183,82	27,12	161,14 206,50	
Layer 2	138,17	20,31	121,19 155,15	

Tabelle 14: GWA - Gruppe A und Gruppe B; nach Layers aufgeteilt

Weiter verdeutlicht wird dies in Abbildung 27: Durch den flacheren Verlauf der GWA-Kurve in Gruppe A, liegt diese in den oberflächlichen Regionen unterhalb der Kurve von Gruppe B. Ab Feld 4 dreht sich die Situation und die Grauwerte von Gruppe B sind in den Feldern 5 bis 9 stets niedriger als die von Gruppe A. Hiervon kann die Tendenz eines niedrigeren PG-Gehalts in älteren Patellae an der Knorpeloberfläche abgeleitet werden.

Sortiert man die Grauwerte nach dem Sterbealter der Patellae, zeigt der Linear Fit einen schwachen ($R^2 = 0,0007$), nicht signifikanten ($p=0,90$) jährlichen Anstieg der Grauwerte um 0,1115 Punkte (siehe Abbildung 24).

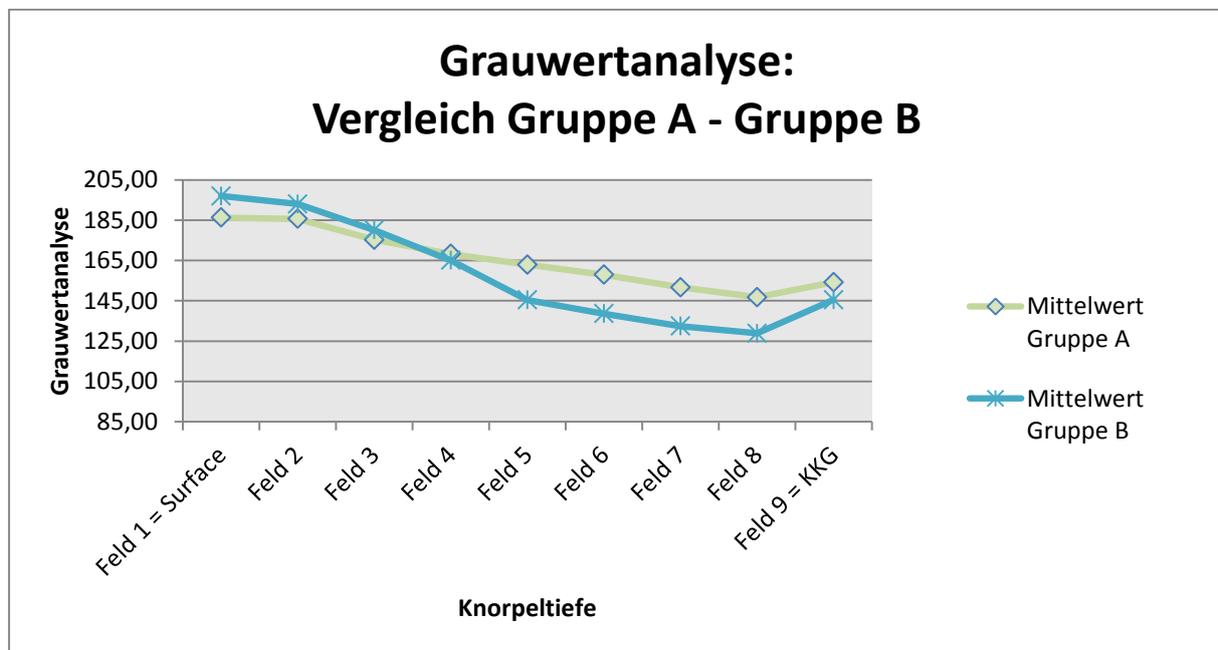


Abbildung 27: GWA - Gruppe A und Gruppe B; Verlauf der GWA in den einzelnen Feldern

5.3.3 GWA in männlichen und weiblichen Proben

Die weiblichen Patellae zeichnen sich durch höhere GWA-Werte als die männlichen aus (siehe Tabelle 15). Im Durchschnitt liegen die männlichen Proben bei $160 \pm 29,5$, wohingegen die weiblichen Proben einen Mittelwert von $171 \pm 29,2$ einnehmen. Tabelle 15 unterstreicht diese Feststellung, hier zeigt sich, dass die Grauwerte der weiblichen Patellae in allen 9 Feldern über denen der männlichen Patellae liegen.

Grauwertanalyse: männliche vs. weibliche Pat.			
	Mittelwert männlich	Mittelwert weiblich	p-Wert
Feld 1 = Surface	187	197	0,44
Feld 2	185	196	0,48
Feld 3	173	185	0,43
Feld 4	163	176	0,43
Feld 5	154	163	0,61
Feld 6	147	160	0,42
Feld 7	141	154	0,36
Feld 8	137	149	0,31
Feld 9 = KKG	148	159	0,32
Layer 1	177	188	0,44
Layer 2	145	157	0,40
gesamter Knorpel	160	171	0,40

Tabelle 15: GWA - männlich und weiblich; einzelne Felder, Layers und p-Werte

Tendenziell liegen die Grauwerte der weiblichen Patellae in allen Einzelfeldern als auch in den Mittelwertberechnungen für Layer 1 und Layer 2 über den Grauwerten der männlichen Patellae. Bei p-Werten von 0,31 (Feld 8) bis maximal 0,61 (Feld 5) kann hierbei nicht von einem signifikanten Unterschied ausgegangen werden.

5.4 Ergebnisse der Rasterelektronenmikroskopischen Auswertung

Wie bei der Auswertung der histologischen Ergebnisse, wurden nur die REM-Proben der Patellae verwendet, bei denen auch ein vollständiger MRT-Datensatz vorliegt. Hierfür wurden insgesamt 43 Knochen-Knorpel-Zylinder aus 27 Patellae gewonnen, 16 aus der medialen Facette, 27 aus der lateralen Facette.

Es wurden 19 Patellae mit einem Durchschnittsalter von 27,6 Jahren der Gruppe A zugeordnet, Gruppe B setzt sich aus acht Patellae zusammen (durchschnittliches Sterbealter 63,4 Jahre). 20 Proben waren von männlichen Patellae, sieben Stück von weiblichen.

Mittelt man über alle Patellae, erreicht die Radiärzone mit einem durchschnittlichen Anteil von $60,0 \pm 12,0$ % an der Gesamtknorpeldicke den höchsten Wert die zweitdickste Schicht bildet die Transitionalzone mit $35,6 \pm 10,6$ %. Die oberflächliche Tangentialzone ist mit nur durchschnittlich $4,4 \pm 2,4$ % die dünnste Zone (siehe Tabelle 16).

In nahezu jeder einzelnen Messung ist die Radiärzone die dickste Schicht. Ausnahmen bilden hier lediglich Patella 15, 16, 18, 19 und 38 mit einer dickeren Transitionalzone.

Mit über 80% Anteil ist die Radiärzone in Patella 54 (männlich, 10 Jahre) am dicksten von allen gemessenen Proben (siehe Abbildung 28). Da bei dieser Probe aufgrund des jungen Sterbealters noch nicht von einer vollständig ausgebildeten Kollagenfaserarchitektur auszugehen ist, wird Patella 54 aus der weiteren Auswertung der Elektronenmikroskopie ausgeschlossen.

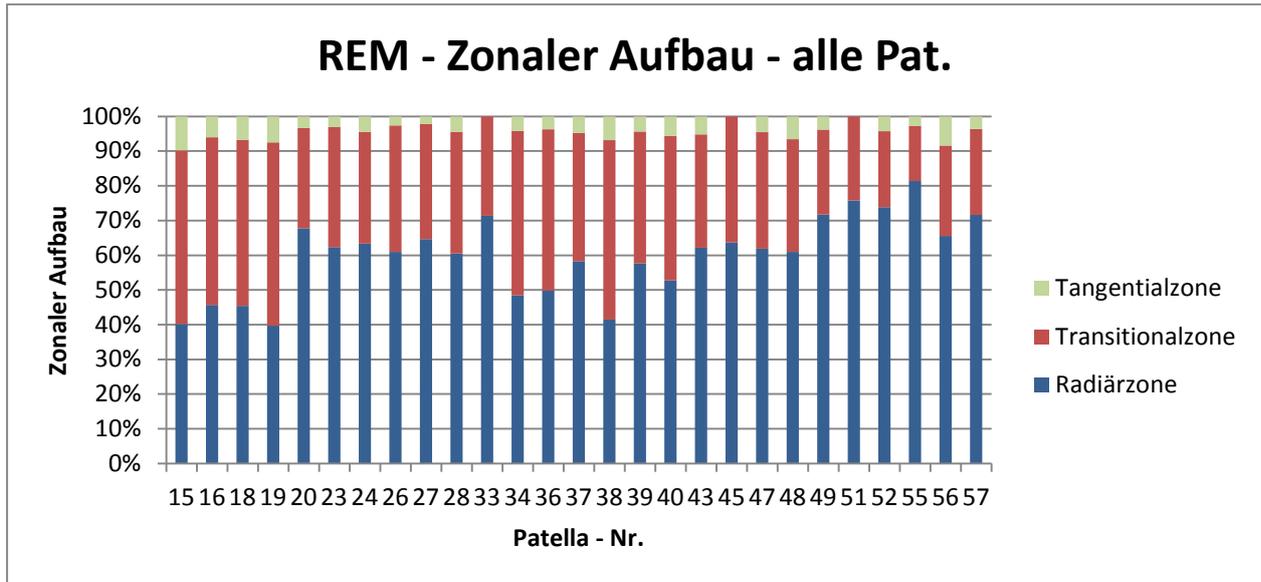


Abbildung 28: Schematische Übersicht über zonalen Aufbau der einzelnen Patellae

REM-Zonale Dicken	Mittelwert	STABW	STAB%	95%KI
Tangentialzone	4,40	2,38	55,21	3,52 5,28
Transitionalzone	35,63	10,58	30,37	31,71 39,55
Radiärzone	59,96	11,99	19,72	55,52 64,40

Tabelle 16: Prozentuale Dicken der einzelnen Zonen; Mittelungen aus allen Patellae

5.4.1 Vergleich der REM-Auswertung zwischen männlichen und weiblichen Patellae

Unter den insgesamt 27 Patellae waren 20 männliche und sieben weibliche. Tabelle 17 kann entnommen werden, dass es keinen signifikanten ($p=0,91$) zwischengeschlechtlichen Unterschied bezüglich des zonalen Aufbaus gibt.

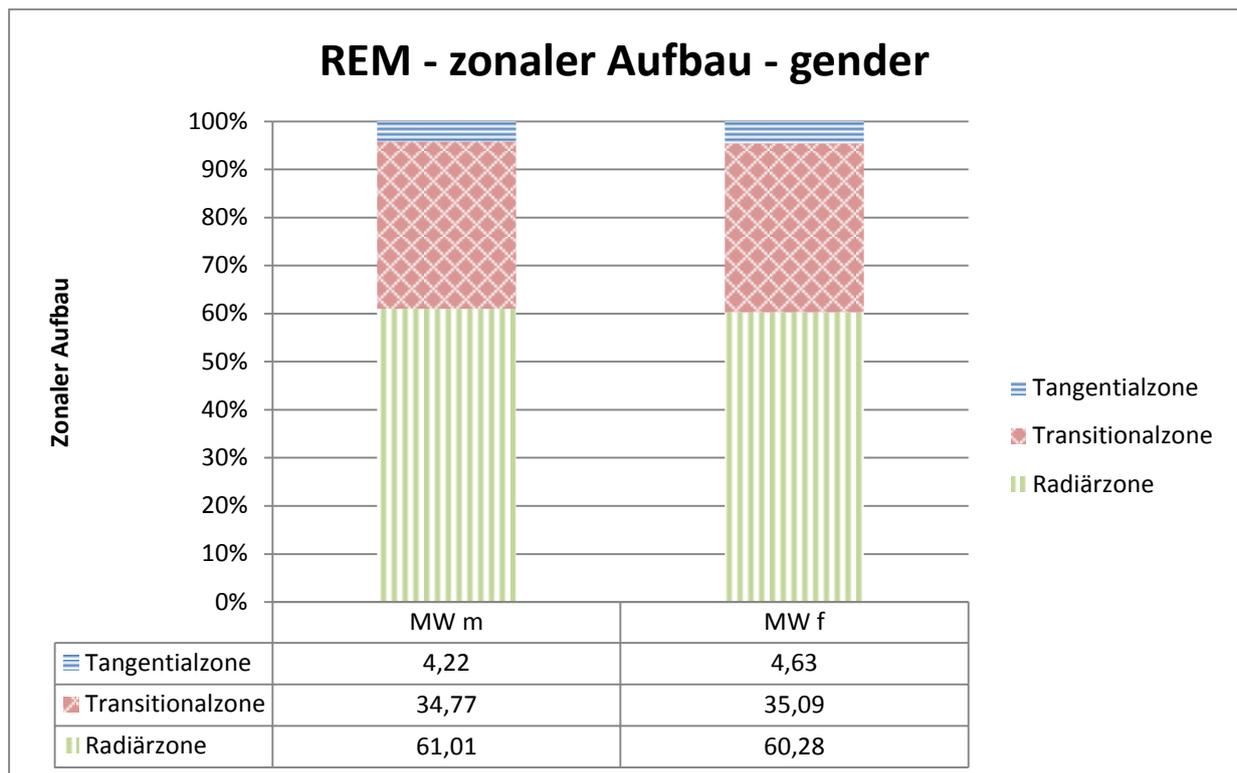


Abbildung 29: REM - Prozentuale Dicken der einzelnen Zonen . männliche und weibliche Patellae aufgetrennt

REM – Dicke der Radiärzone	Mittelwerte	STABW	95%KI	P-Wert
männlich	61,01	11,45	55,80 66,22	0,91
weiblich	60,28	14,50	46,87 73,69	

Tabelle 17: REM - Prozentuale Dicke der Radiärzone - männliche und weibliche Patellae

5.4.2 Vergleich der REM-Auswertung zw. Gruppe A und Gruppe B

Bezüglich der Dicke der Tangentialzone findet sich kaum ein Unterschied zwischen Gruppe A und B. Die Radiärzone jedoch ist mit $67,0 \pm 12,8\%$ in Gruppe B deutlich, jedoch knapp nicht signifikant ($p=0,07$) dicker als in Gruppe A ($57,0 \pm 9,5\%$), dafür ist die Transitionalzone in Gruppe A mit $38,6 \pm 7,9\%$ zu $28,7 \pm 11,2\%$ signifikant dicker als in Gruppe B ($p < 0,05$) (siehe Abbildung 30).

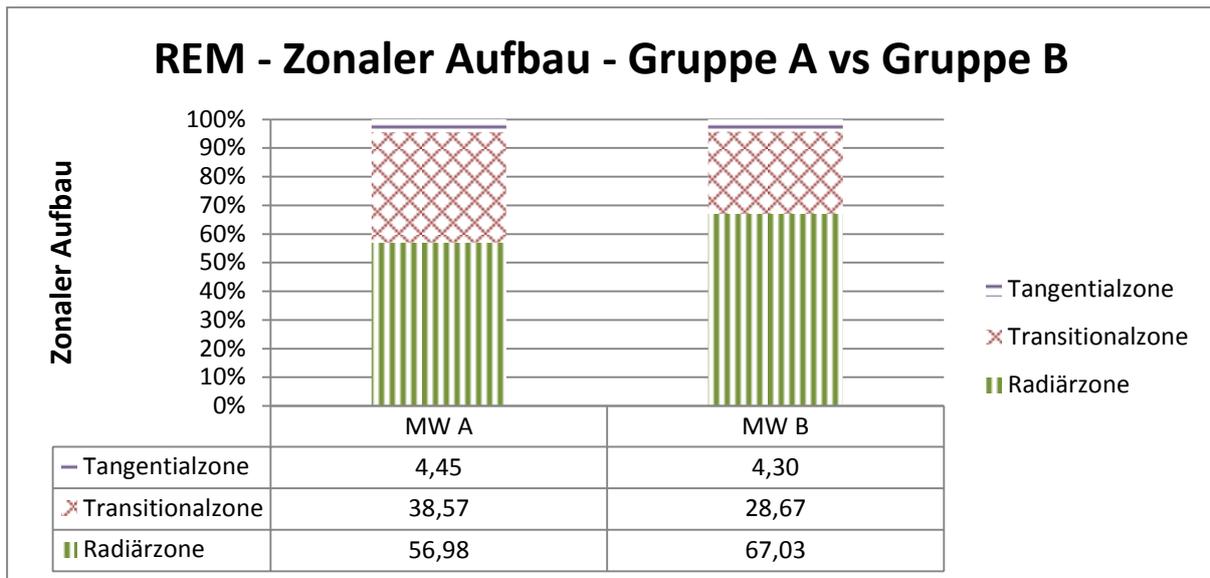


Abbildung 30: REM - Prozentuale Dicken der einzelnen Zonen . Gruppe A und Gruppe B einzeln aufgetrennt

Zudem nimmt die gemessene prozentuale Dicke der Radiärzone mit zunehmendem Alter um ca. 0,53 % pro Jahr zu (siehe Abbildung 31). Bei einem Bestimmtheitsmaß (R^2) von 0,14 und einem Korrelationskoeffizienten von 0,37 kann man bei einem p-Wert von 0,06 nur von einem schwachen, nicht signifikanten Zusammenhang sprechen.

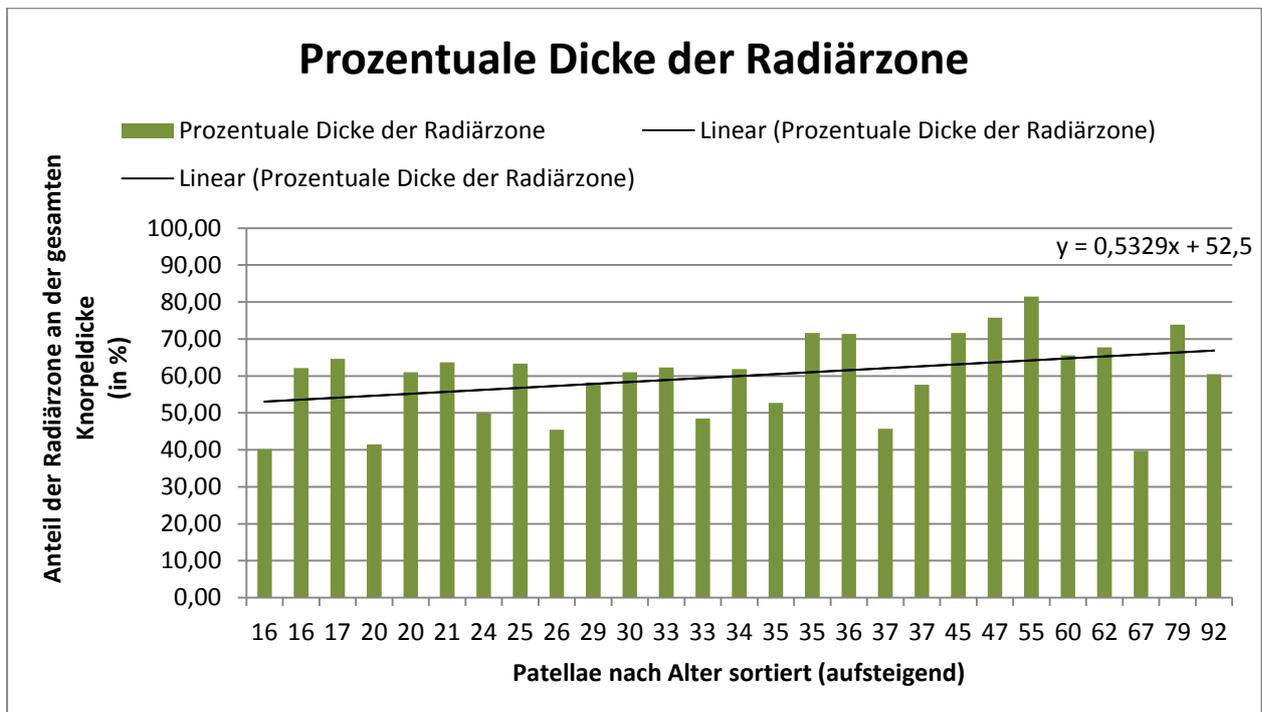


Abbildung 31: REM - Prozentuale Dicke der Radiärzone nach Alter sortiert. inklusive Linear Fit; $R^2=0,14$; $r=0,37$; $p=0,056$

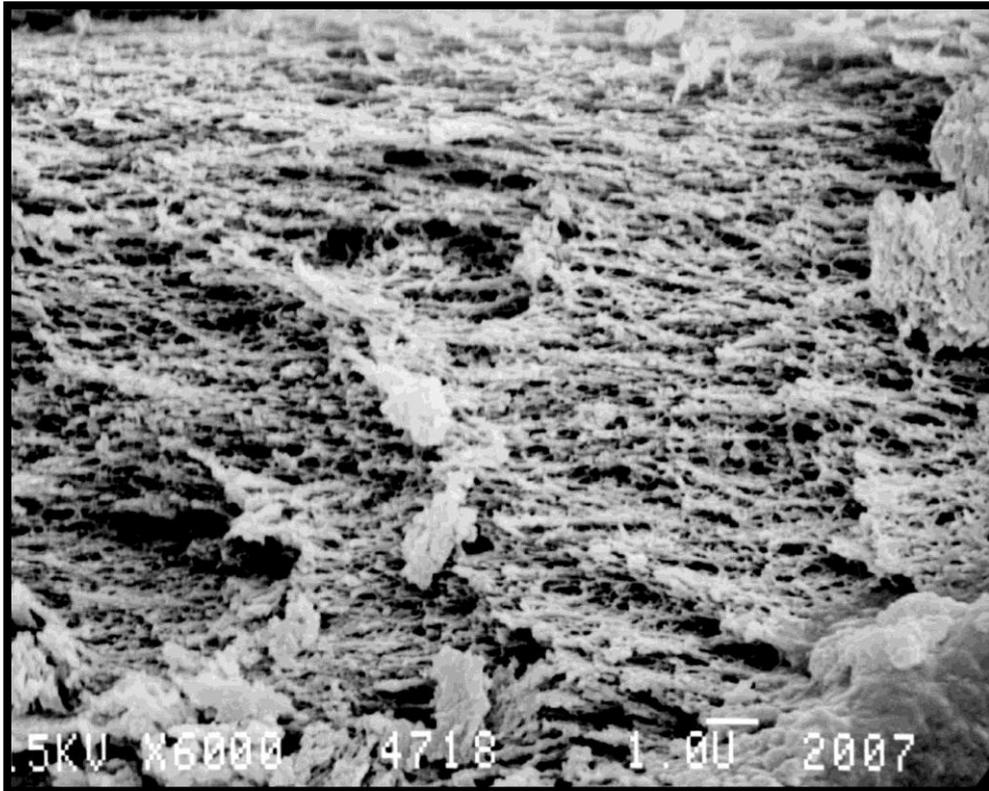


Abbildung 32: Patella 21, Bohrzylinder aus der lateralen Facette, ca. 6000x vergrößert. Tangentialzone

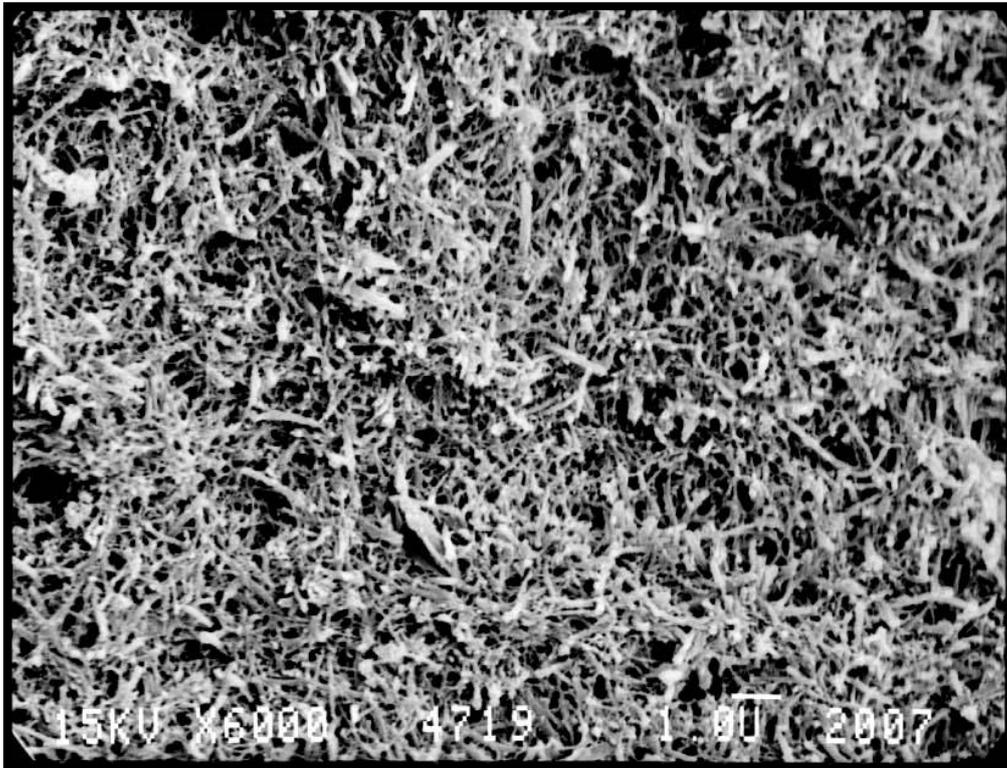


Abbildung 33: Patella 21, Bohrzylinder aus der lateralen Facette, ca. 6000x vergrößert. Transitionalzone

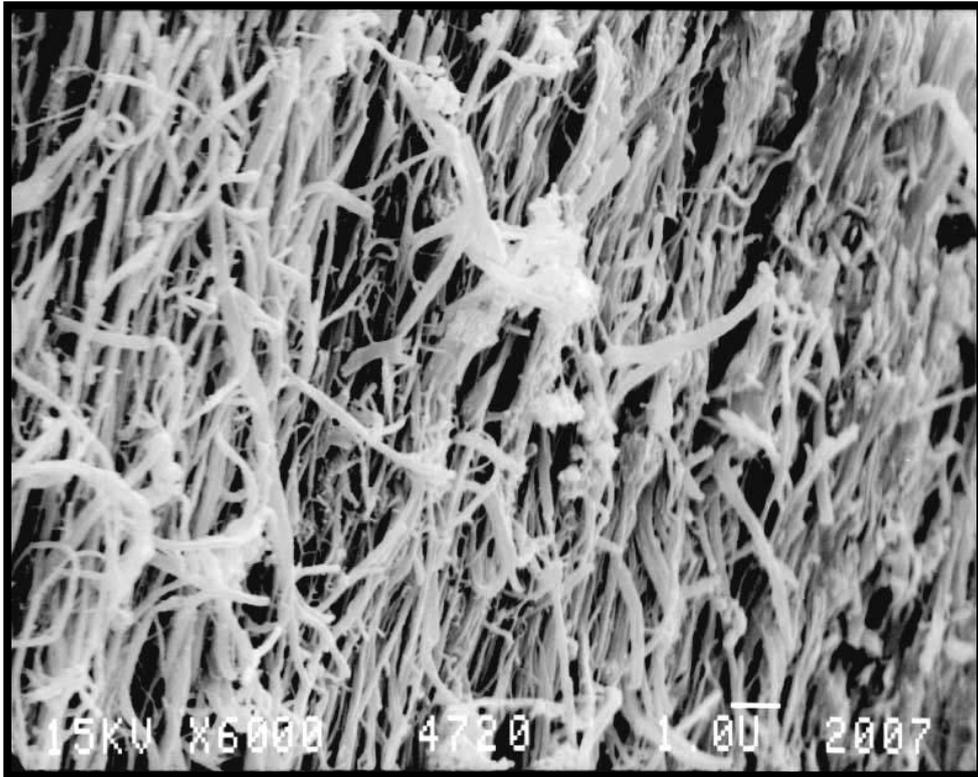


Abbildung 34: Patella 21, Bohrzylinder aus der lateralen Facette, ca. 6000x vergrößert. Radiärzone

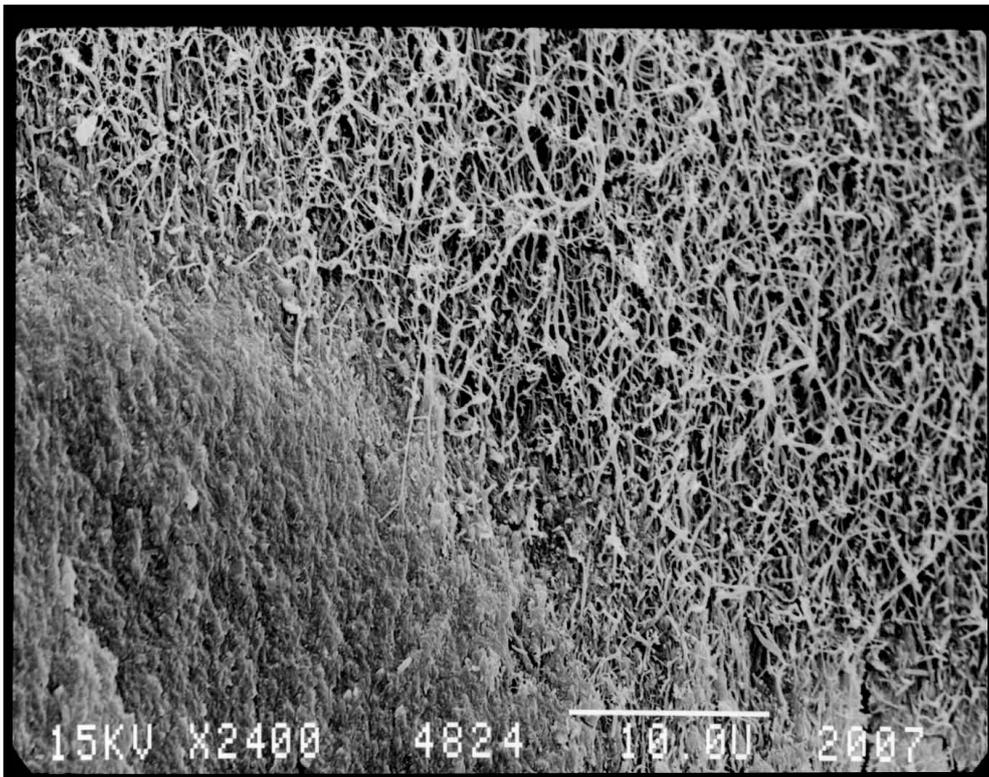


Abbildung 35: Patella 21, Bohrzylinder aus der lateralen Facette, ca. 2400x vergrößert. Tide Mark

5.5 Auswertung des Wassergehalts

Insgesamt wurden aus 32 verschiedenen Patellae Bohrproben zur Bestimmung des Wassergehaltes entnommen. In die weitere Auswertung gelangten 23 Patellae, von welchen auch verwertbare MRT-Datensätze vorhanden waren.

Somit wurden 18 Proben aus 17 männlichen Patellae und sieben Proben aus sechs weiblichen Patellae untersucht. Sechs Knorpel-Bohrzylinder stammten aus der medialen Facette, 19 aus der lateralen Facette.

Gruppe A setzt sich aus insgesamt 15 Proben zusammen, Gruppe B besteht aus 8 Proben.

Den niedrigsten Wassergehalt weist Patella 19 (67 Jahre) auf, mit lediglich 59,2%; in Patella 55 (55 Jahre) findet sich mit 78,8% die höchste Konzentration an Wasser.

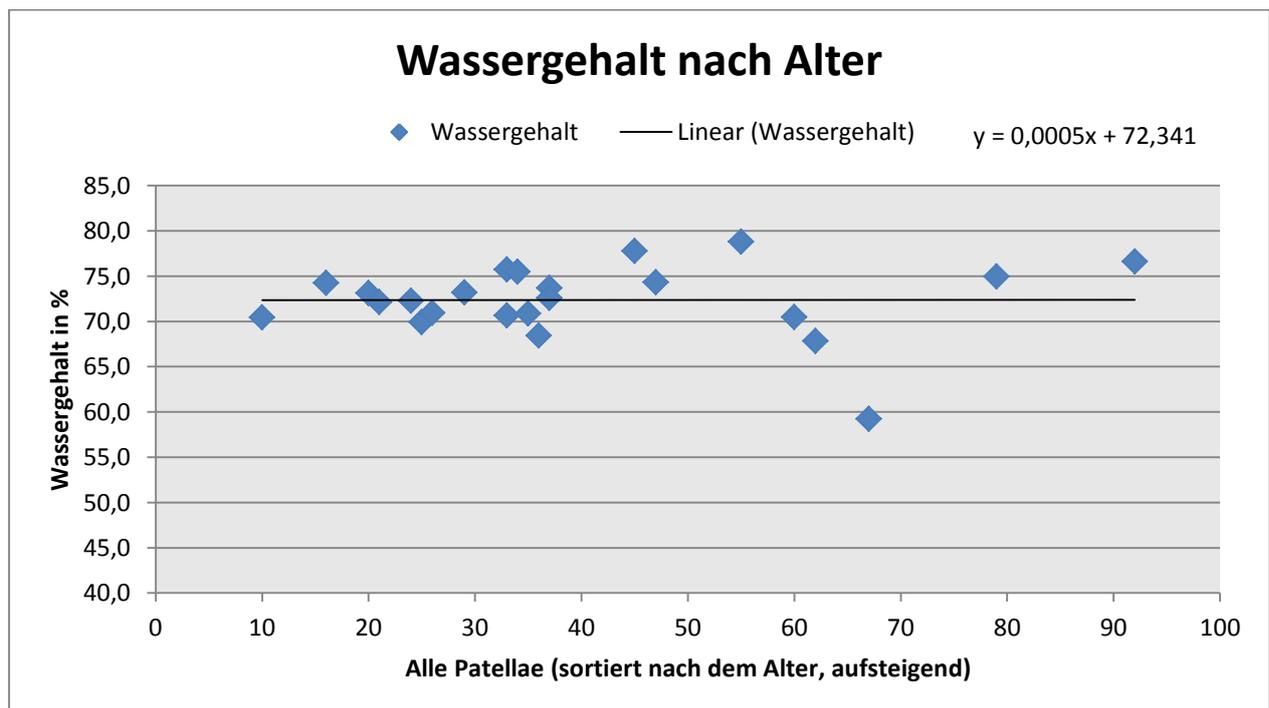


Abbildung 36: Wassergehalt aller Patellae, nach Alter aufsteigend sortiert. Inklusive Regressionsgerade; $R^2 < 0,0001$; $r = 0,0026$; $p = 0,99$

Wie man Abbildung 36 entnehmen kann, zeigt die Regressionsgerade eine zu vernachlässigende Änderung des Wassergehaltes mit zunehmendem Alter mit folgenden Korrelationsparametern: $R^2 < 0,0001$; $r = 0,0026$; $p = 0,99$

Wassergehalt	Mittelwert	STABW	STABW(%)	95% KI	P-Wert
Gruppe A	72,3	2,07	2,87	71,25 73,35	0,92
Gruppe B	72,5	6,50	8,96	68,00 77,00	

Tabelle 18: Prozentualer Wassergehalt in Gruppe A und Gruppe B

Dies wird erneut verdeutlicht durch Tabelle 18. Der durchschnittliche Wasseranteil in Gruppe A unterscheidet sich mit $72,3 \pm 2,9$ % auf einem Signifikanzniveau von $p = 0,92$ nur unwesentlich von dem der Gruppe B: $72,5 \pm 9,0$ %.

5.6 Korrelation von ADC und GWA

Um die mithilfe der Diffusions-Tensor-Bildgebung erworbenen Daten mit den Grauwerten aus der histologischen Auswertung korrelieren zu können, wurde ein Scatterplot angefertigt. Auf der horizontalen Achse wurden die Werte der Grauwertanalyse eingezeichnet, die y-Achse entspricht den ADC-Werten. Insgesamt wurden hier die Werte von 23 Patellae verglichen.

Im Scatterplot verwendete Patellae		
Patella	Alter (Jahre)	Geschlecht
15	16	männlich
16	37	weiblich
18	26	weiblich
19	67	männlich
20	62	männlich
23	33	männlich
24	25	männlich
28	92	männlich
34	33	männlich
36	24	weiblich
37	29	weiblich
38	20	männlich
39	37	männlich
40	35	männlich
43	16	männlich
47	34	männlich
49	35	männlich
51	47	weiblich
52	79	männlich
54	10	männlich
55	55	weiblich
56	60	weiblich
57	45	männlich
<i>Anzahl</i>	<i>Mittelwert:</i>	<i>16x männlich</i>
<i>23</i>	<i>39,9</i>	<i>7x weiblich</i>

Tabelle 19: Übersicht über alle im Scatterplot verwendeten Patellae

Der erste Scatterplot (Abbildung 37) vergleicht den mittleren ADC pro Patella mit dem Mittelwert der GWA über alle Felder. Abbildung 38 dient einer etwas feineren Auflösung: Hier werden die je in Layer 1 und Layer 2 errechneten Werte separat miteinander verglichen.

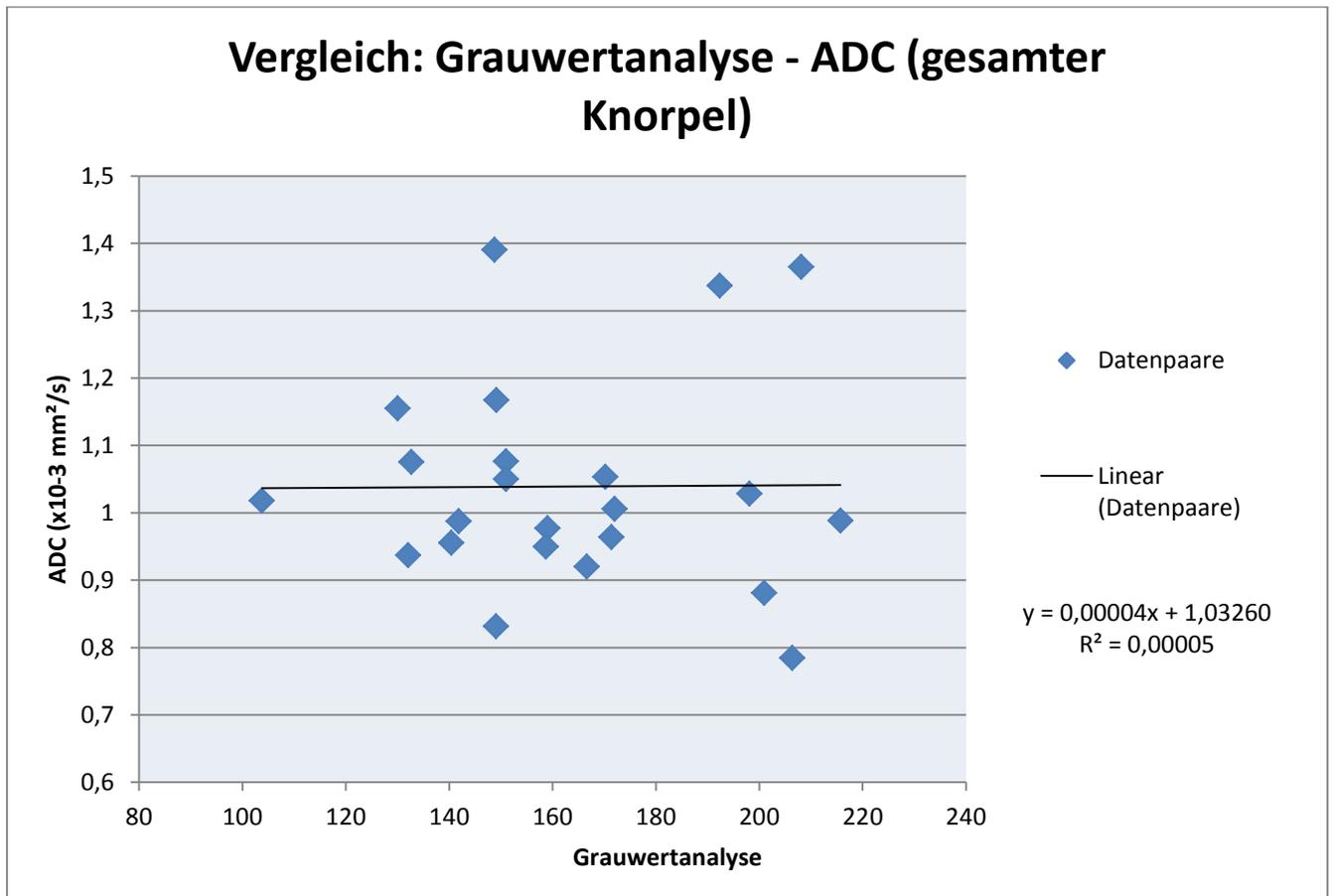


Abbildung 37: Korrelation GWA-ADC der Mittelwerte über den gesamten Knorpel. Mit Regressiongeraden und Bestimmtheitsmaß R^2 . $r=0,007$; $p=0,97$.

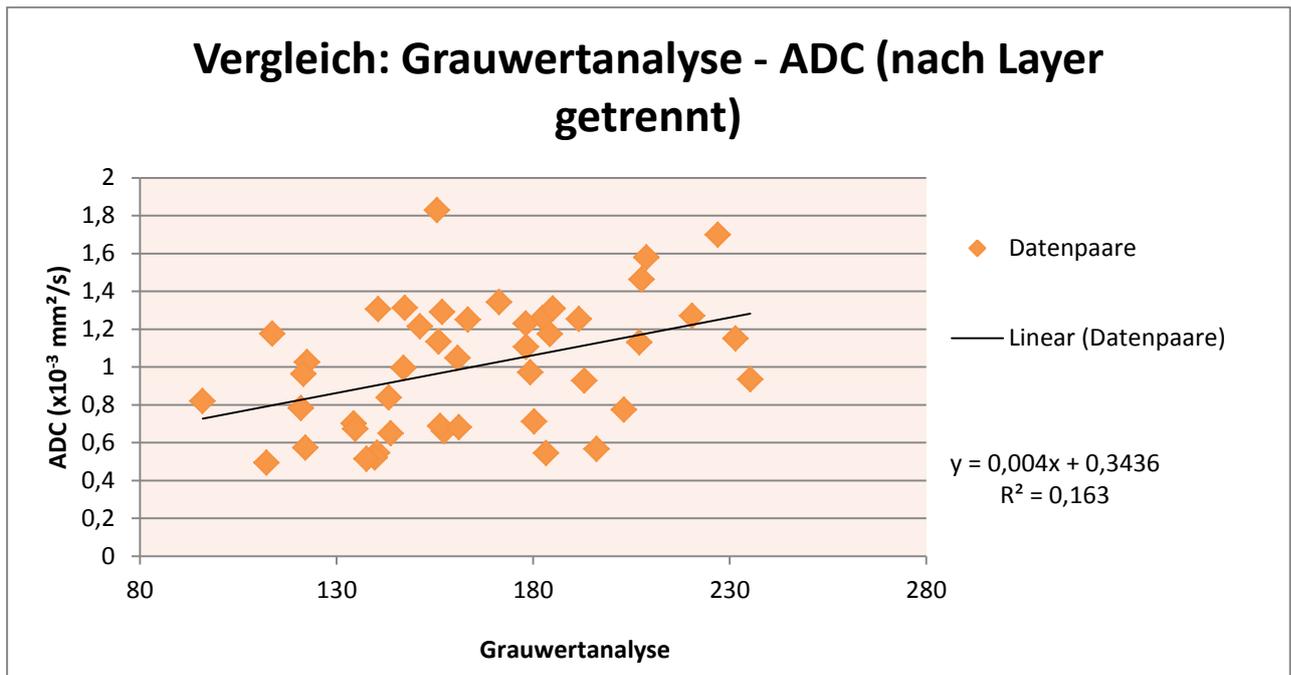


Abbildung 38: Korrelation GWA-ADC nach Layers aufgeteilt. Mit Regressionsgeraden und Bestimmtheitsmaß R^2 . $r=0,404$; $p=0,006$.

Die in Abbildung 37 eingefügte Trendlinie zeigt, dass es mit zunehmenden GWA-Werten nur zu einem geringen tendenziellen Anstieg des ADC kommt. Patella 36 (weiblich, 24 Jahre) stellt hierbei mit dem höchsten ADC-Mittelwert von $1,39 \times 10^{-3}$ mm²/s bei einem GWA-Wert von lediglich 148,74 einen Ausreißer nach oben dar.

In Abbildung 38 zeigt sich nach Unterteilung in Layer 1 und Layer 2 bei der doppelten Anzahl an Wertepaaren nun eine deutlich ansteigende Trendlinie. Ausgehend von diesem Plot könnte man annehmen, dass mit zunehmendem GWA-Wert auch der ADC ansteigt.

Der sich aus Abbildung 38 ergebende Korrelationskoeffizient spricht mit einem Wert von $r = 0,404$ ($R^2=0,163$) für eine schwache lineare Korrelation. Gemäß Formel 11 lässt sich somit ein t-Wert von 2,93 errechnen.

Nach Unterteilung in die einzelnen Layers zeigt die Korrelation zwischen der GWA und DTI eine deutliche Signifikanz ($p=0,006$).

6. Diskussion

Die MRT hat sich in der klinischen Routine mittlerweile als Methode etabliert, degenerative Gelenkveränderungen beurteilen zu können. Um jedoch bereits präarthrotische Läsionen frühzeitig diagnostizieren zu können, werden im Rahmen von Studien neue, sensitivere Messesequenzen gesucht. Die Diffusions-Tensor-Bildgebung besitzt die Möglichkeit, Rückschlüsse auf mikroskopische Gegebenheiten und strukturellen Aufbau von Geweben zu liefern, weshalb sie in experimentellen Studien zunehmend zur Untersuchung der Knorpelintegrität verwendet wird.

Diese Arbeit erlaubt es, eine Korrelation der DTI-Parameter mit den anatomischen Gegebenheiten des humanen, makroskopisch nicht degenerierten Gelenkknorpel zu erstellen. Hierfür wird als repräsentative Probe der Retropatellarknorpel untersucht.

6.1 Diskussion des Studiendesigns

Ein Vorteil dieser Arbeit ist, dass wir MRT-Untersuchungen des menschlichen Retropatellarknorpels in vitro am klinischen MR-Scanner anfertigen und zudem Informationen über die tatsächliche Knorpelbeschaffenheit durch die GWA-Bestimmung und die REM erwerben konnten.

Eine Besonderheit dieser Arbeit gegenüber anderen Studien ist, dass hier humane Knorpelproben verwendet werden konnten. In anderen Studien bedient man sich häufig tierischer Knorpelproben als Ersatzmodell, wie Rinderpatellae¹⁰⁰, Hasenpatellae¹⁰¹ oder Rattenpatellae.¹⁰² Bedingt durch den aufrechten Gang des Menschen und ein komplett unterschiedliches Bewegungsmuster, unterscheiden sich die Anforderungen an das menschliche Kniegelenk maßgeblich von denen, die an den tierischen Bewegungsapparat gestellt werden.

¹⁰⁰ DeVisser SK et al., 2007

¹⁰¹ Calve E et al., 2001

¹⁰² Watrin A et al., 2001; Loeuille D et al., 1998

Dieses unterschiedliche Anforderungsprofil hat Auswirkungen auf den makroskopischen und mikroskopischen Aufbau des Retropatellarknorpels.¹⁰³

Andere Studien verwenden menschliche Knorpelproben zur Anfertigung der histologischen Korrelate, welche im Rahmen von Totalendoprothesen-Operationen¹⁰⁴ entfernt werden. Hierbei ist jedoch von ausgeprägten degenerativen Veränderungen auszugehen, wohingegen in dieser Arbeit makroskopisch weitestgehend intakter Knorpel untersucht werden konnte.

MRT-Messungen, die in vivo an jungen Patienten durchgeführt werden, wären die optimale Möglichkeit, DTI-Eigenschaften des gesunden menschlichen Knorpels zu untersuchen. Jedoch wäre es bei einem solchen Studiendesign unmöglich, eine Korrelation mit dem tatsächlichen PG-Gehalt oder der Beschaffenheit des Kollagenfasengerüsts zu erstellen. Des Weiteren sind in-vivo-Messungen aufgrund der recht langen Akquisitionszeiten keinem Probanden zuzumuten.

Lediglich die Verwendung von Leichenpatellae erlaubt es, intakten Knorpel von gesunden Probanden mit degeneriertem Knorpel zu vergleichen¹⁰⁵ sowie eine Korrelation von MRT-Datensätzen und anatomisch-histologischen Grundlagen durch deren weitere Aufarbeitung zu eruieren.

MRT-Studien des menschlichen Knorpels werden seit über 20 Jahren auch post mortem durchgeführt und liefern bei richtiger Vorbereitung des Knorpels ähnliche Ergebnisse, wie in-vivo-Studien.¹⁰⁶

Uns lag für diese Arbeit nur eine begrenzte Anzahl an Leichenpatellae vor, was zu einer uneinheitlichen Zusammensetzung der zu betrachtenden Gruppen führte.

Die Gruppeneinteilung wurde erschwert durch die Tatsache, dass der Anteil junger Menschen, die an den Folgen einer Intoxikation, nach Gewalttaten oder suizidalem Handeln versterben und in Folge dessen einer gerichtsmedizinischen Obduktion unterzogen werden, deutlich höher ist als der älterer Menschen. Oben genannte Todesursachen treten zudem vermehrt bei Personen männlichen Geschlechts auf.

¹⁰³ Kummer B, 2005

¹⁰⁴ Trattig S et al., 1999

¹⁰⁵ Loeuille D et al., 1998

¹⁰⁶ Gylys-Morin VM et al, 1987

Infolgedessen standen mehr Patellae zur Verfügung, die Gruppe A zuzuordnen waren (Sterbealter < 45 Jahren) und auch wesentlich mehr männliche als weibliche Patellae.

Die Gruppentrennung bei dem 45. Lebensjahr war ebenso ein willkürlich gewählter Cut Off. Mit arthrotischen Veränderungen kann zwar gerechnet werden, jedoch liegt laut Studienlage die Prävalenz von Arthrose in einer Bevölkerung über 45 Jahren bei lediglich 15%.¹⁰⁷ Die Einteilung in Untergruppen erfolgte nur in Abhängigkeit von dem jeweiligen Sterbealter. Eine Einteilung in Grade der Degeneration fand nicht statt, man ging von einem Modell der stetigen Degeneration aus. Lediglich Patellae mit makroskopisch ausgeprägter Degeneration wurden im Vorfeld ausgeschlossen.

In Anbetracht der geringen Zahl älterer Patellae wäre eine weitere Unterteilung nicht sinnvoll gewesen, dennoch wurde in den einzelnen Auswertungen zur besseren Beurteilung eventueller alters-assoziierter Trends eine Darstellung der jeweiligen Werte nach dem Alter aufsteigend erstellt.

Auf die Todesursachen wird nicht eingegangen, außerhalb der gerichtsmedizinischen Obduktionen waren diese nicht bekannt.

Durch den hohen logistischen Aufwand der verschiedenen Untersuchungen konnten zu manchen Patellae keine histologischen oder rasterelektronischen Daten gewonnen werden, zudem kam es durch Fehler in der Akquisition der DTI-Messergebnisse zu einigen fehlerhaften und somit unbrauchbaren Datensätzen (meist bedingt durch Wirbelstrom-Effekte). Infolgedessen gelangten von anfänglich 47 Patellae, die bei 256 x 256 Voxel gemessen wurden, nur 30 Stück in die endgültige Auswertung und nur 23 Patellae in die Korrelationsanalyse.

Kritisch anzumerken, in Bezug auf die Wahl des Materials und die Verteilung der Gruppen in dieser Arbeit ist, dass im Rahmen der Auswertung lediglich Rücksicht auf Geschlecht und Alter der Patellae genommen wurde. Wichtige, den Zustand des Kniegelenkknorpels maßgeblich beeinflussende Faktoren, wie belastende berufliche

¹⁰⁷ Murphy L et al., 2008

und sportliche Tätigkeiten¹⁰⁸, oder Vorerkrankungen, wie Diabetes mellitus, konnten post mortem nicht eruiert werden.

Hinsichtlich des Ernährungszustandes wurde jeweils der BMI errechnet, eine weitere Unterteilung ist nicht erfolgt. Patellae von über- oder untergewichtigen Personen wurden aus der weiteren Auswertung nicht ausgeschlossen.

Dennoch erlaubt dieses Studiendesign erstmals an einer vergleichsweise großen Stichprobe (n=23) mit makroskopisch intaktem Knorpel DTI-Parameter zu ermitteln und diese mit den anatomischen Gegebenheiten zu korrelieren.

¹⁰⁸ Rajabi R et al., 2012

6.2 Diskussion der Methoden

Um die Auswirkungen der Kollagen- und Proteoglykanverteilung im Gelenkknorpel auf die durch MRT akquirierten Signale exakter untersuchen zu können, haben sich die histologische Anfärbung von Proteoglykanen und die REM zur Beurteilung der Kollagenfaserarchitektur bewährt.¹⁰⁹

6.2.1 Diskussion der Diffusions-Tensor-MRT

Aus der Bildgebung des Bewegungsapparates ist die Magnetresonanztomographie heutzutage nicht mehr weg zu denken. Sie erlaubt es bereits wesentlich früher, als die konventionelle Röntgendiagnostik, beginnende degenerative Veränderungen zu diagnostizieren. Dies kann durch den Nachweis einer vermehrten Wassereinlagerung in den Knorpel¹¹⁰ oder ein Abnehmen der Knorpeldicke im Alter¹¹¹ erfolgen. Mit zunehmender Feldstärke der Magnetresonanztomographen nehmen auch die Möglichkeiten der Knorpeldiagnostik zu. So können bei höheren Auflösungen bereits kleine, fokale Läsionen detektiert werden.¹¹² Dardzinski BJ et al. fertigten bereits 1997 in vivo T2-Maps gesunder Probanden an.¹¹³

Die in dieser Arbeit angewandte Diffusions-Tensor-Magnetresonanztomographie ist eine MRT-Technik, die es möglich macht, das Ausmaß der Diffusion von Wassermolekülen in einer bestimmten Richtung zu messen und es somit erlaubt, eine Aussage zur Mikrostruktur eines Gewebes treffen zu können. Bereits 1996 konnte gezeigt werden, dass diffusionsgewichtete MRT-Sequenzen das Potential besitzen, Rückschlüsse auf die Anisotropie von Gewebe treffen zu lassen.¹¹⁴ Hierbei wurden Diffusionen an cerebralem Gewebe gemessen, welches aufgrund der Anordnung der Nervenfasern eine hohe Anisotropie besitzt. Da auch Knorpel einen

¹⁰⁹ Raya JG et al., 2011

¹¹⁰ Calvo E et al., 2001

¹¹¹ Watrin A et al., 2001

¹¹² Loeuille D et al., 1997

¹¹³ Dardzinski BJ et al., 1997

¹¹⁴ Pierpaoli C et al., 1996

von Faserverläufen dominierten Aufbau besitzt, kann ein diffusionsgewichtetes MRT auch Informationen über den mikroskopischen Aufbau des hyalinen Knorpels liefern.

Vor ca. 20 Jahren wurde mit der Diffusions-Tensor-Bildgebung eine Methode entwickelt, die es der diffusionsgewichteten MRT erlaubt, Aussagen über die Richtung der Diffusion zu treffen.¹¹⁵

Die neuesten Studien zur DTI des Gelenkknorpels wurden weitestgehend an Hochfeld-MR-Tomographen durchgeführt. Diese erlauben es, Zusammenhänge der DTI-Bildgebung besser zu verstehen, um diese später auf die medizinische Diagnostik am Patienten zu adaptieren.¹¹⁶

So konnten bei 9,4 T bzw. 17,6 T Feldstärke Korrelationen zwischen der Zusammensetzung des Kollagengerüsts und der FA sowie den Eigenvektoren gefunden werden, zudem zeigte sich eine Signifikanz bezüglich des ADC-Anstiegs bei abfallender Proteoglykankonzentration.¹¹⁷ Nach Dehydration des Knorpels konnten Gruber et al. bei 9,4 T eine Veränderung der mittleren Diffusion sowie der FA zeigen.¹¹⁸

Die Eigenvektor-Bestimmungen konnten bei 17,6 Tesla gut mit den rasterelektronenmikroskopisch evaluierten Schichtdicken korreliert werden.¹¹⁹ Auf die Auswertung der Eigenvektoren wird in dieser Arbeit dennoch, aufgrund der niedrigeren lokalen Auflösung bei 1,5 Tesla, verzichtet.

Obwohl die DTI das Potential besitzt, Veränderungen in der Zusammensetzung der Knorpelmatrix nachzuweisen, existieren bis jetzt keinerlei Daten, die das Verhalten von hyalinem Knorpel in der Diffusions-Tensor-Bildgebung durch einen in der Klinik angewandten 1,5 T MR-Scanner beschreiben.

Die DTI teilt jedem Voxel eine Vielzahl an Informationen zu. Dieses Potential birgt allerdings auch eine gewisse Anfälligkeit für bestimmte Störfaktoren. So kann es an den Grenzflächen, auch bedingt durch die reduzierte Auflösung, zu Partialvolumeneffekten kommen. An der Knorpeloberfläche besteht die Möglichkeit,

¹¹⁵ Bassar PJ et al., 1994

¹¹⁶ Behr VC et al., 2004

¹¹⁷ De Visser SK et al., 2008; Raya JG et al., 2011

¹¹⁸ Gruber CE et al., 2010

¹¹⁹ Raya JG et al., 2011

dass die Benetzung der Lamina splendens mit 0,9% NaCl das Signal der obersten Voxelreihe verändert und somit zu einer Verfälschung der Werte an der Knorpeloberfläche führt.

Ein weiterer Nachteil der in dieser Arbeit angewandten Sequenzen stellt die Länge der Messdauer dar. Zur Verbesserung des SNR wurden pro Diffusionsrichtung 6 Wiederholungen durchgeführt, wodurch sich die gesamte Akquisitionszeit auf über 3 Stunden verlängerte. MR-Scanner mit höheren Feldstärken erlauben allerdings bereits die Akquisition eines DTI-Signals in wenigen Minuten. Diese Hochfeld-Geräte sind jedoch in der klinischen Routine noch kaum verbreitet.

6.2.2 Diskussion der Grauwertanalyse

Die Bestimmung des Proteoglykangehaltes erfolgte durch eine Färbung des Knorpels mit Safranin-O, gefolgt von einer quantitativen Proteoglykanbestimmung mithilfe einer Grauwertanalyse.

In Abhängigkeit von Größe und Beschaffenheit wurden pro Patella zwischen einem und vier repräsentative Bohrzylinder entnommen. Manche Ergebnisse aus der Grauwertanalyse stellen somit nur den Grauwert eines einzigen histologischen Präparates dar, andere spiegeln den Mittelwert aus bis zu vier Anfärbungen wieder und sind damit repräsentativer für den gesamten Knorpel.

Safranin-O hat sich als Standardfärbung des hyalinen Gelenkknorpels etabliert.¹²⁰ Der Farbstoff bindet orthochromatisch an Polyanionen der Knorpelmatrix¹²¹ und bietet somit eine Möglichkeit der Quantifizierung des Glykosaminoglykangehaltes. Die Färbung ist direkt proportional zum GAG-Gehalt des Knorpels¹²², nur bei sehr niedrigen GAG-Konzentrationen wird die Safranin-O-Färbung unzuverlässig, und man sollte auf immunhistochemische Farbstoffe (Antikörper gegen Chondroitinsulfat oder Keratansulfat)¹²³ zurückgreifen.

¹²⁰ Rieppo J et al., 2003; Martin I et al., 1999

¹²¹ Rosenberg L et al., 1971

¹²² Mankin HJ et al., 1979

¹²³ Camplejohn KL et al., 1988

Nach Kiraly K et al. lässt sich die Bindung des Farbstoffs an die Polyanionen durch Optimierung des pH-Wertes deutlich verbessern.¹²⁴ Bei einem pH-Wert von 4,5 bis 4,6 liegen mehr ionisierte Carboxyl- und Glykosaminoglykanketten frei, sodass hier von einer optimalen Knorpelfärbung auszugehen ist. Wie bereits erwähnt, wurde auch für diese Arbeit eine auf pH 4,6 gepufferte Safranin-O-Färbung angewandt.

Auf eine Gegenfärbung mit Fast Green wurde bewusst verzichtet, da diese unter Umständen eine quantitative Glykosaminoglykanbestimmung mittels Grauwertanalyse stören kann.¹²⁵

Die in dieser Arbeit verwendete Färbung ist dennoch, unter Einhaltung eines bestimmten pH-Wertes, eine der am häufigsten angewandten Methoden zur semiquantitativen Bestimmung des Proteoglykangehaltes und wird bis heute regelhaft als solche verwendet.¹²⁶

Meist wird zur Bestimmung des Glykosaminoglykan- bzw. Proteoglykangehaltes nach Safranin-O-Färbung ein semiquantitatives Verfahren¹²⁷ verwendet. Oft wird dafür auf den Mankin-Score zurückgegriffen¹²⁸, ein 14-Punkte Arthrose-Test, bei dem unter anderem das Ausmaß der Knorpeldegeneration subjektiv durch einen oder mehrere Untersucher beurteilt wird.¹²⁹ Obwohl in diesen Score auch noch weitere Größen mit einfließen, wie zum Beispiel das Erscheinungsbild der Chondrozyten und die allgemeine Struktur des Knorpels, bleibt dieses Verfahren ein subjektiver Score mit eingeschränkter Reproduzierbarkeit.¹³⁰

Mit dem Ziel, den Proteoglykangehalt des Knorpels reproduzierbar zu bestimmen, wurden verschiedene Methoden entwickelt, welche z.T. spezielle Mikroskope mit

¹²⁴ Kiraly K et al., 1996

¹²⁵ Bulstra SK et al., 1993

¹²⁶ Cha MH et al., 2012; Ando W et al., 2012

¹²⁷ Shimizu C et al., 1997

¹²⁸ McGibbon CA et al., 2003

¹²⁹ Van der Sluijs et al., 1992

¹³⁰ Ostergaard K et al., 1997

ständig konstanten Umgebungsbedingungen voraussetzen. Allen zugleich ist eine computerbasierte, meist halbautomatische Bestimmung des Grads der Anfärbung.¹³¹

Auch in dieser Arbeit wurde eine halbautomatische Rechenroutine eingesetzt. Für konstante Umgebungsbedingungen wurde gesorgt, indem alle Fotos von angefärbten Präparaten in einer Sitzung durchgeführt wurden. Als Ergebnis wurden objektivierbare, dimensionslose Grauwerte erhalten, wobei ein niedriger Grauwert für einen hohen Grad an Anfärbung mit Safranin-O spricht.

6.2.3 Diskussion der Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie hat sich als Verfahren etabliert, die Beschaffenheit der Kollagenfaserarchitektur ausgiebig beurteilen zu können.¹³² Anhand der Vorzugsrichtung der Kollagenfasern gelingt es, Tangentialzone, Transitionalzone und Radiärzone voneinander zu unterscheiden und deren jeweilige Schichtdicke festzulegen.

Die Integrität des Kollagengebildes lässt sich, mangels eines etablierten Bewertungssystems, nicht objektiv festhalten. Somit wurde hier auf eine subjektive Einordnung der Faserarchitektur verzichtet. Da alle Proben eine Intaktheit der Kollagenfaserarchitektur in der REM aufwiesen, konnten die zonalen Dicken jedoch weitestgehend problemlos bestimmt werden.

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass der Eindruck entstand, dass die Matrixräume zwischen den Kollagenfasern mit zunehmendem Alter der Patellae meist weiter wurden und eine Identifikation der zonalen Zuordnung bei diesen Knorpelproben leichter fiel.

Zu Problemen bei der Festlegung der zonalen Grenzen kam es nur, wenn beim Gefrierbruch keine sauberen Bruchkanten entstanden. In diesen Fällen traten Schnittflächen auf, die die Identifikation der Kollagenfasern nahezu unmöglich

¹³¹ Lahm A et al., 2012; Moussavi-Harami SF et al., 2009

¹³² McCall JG, 1969

machten. In solchen Fällen wurden die zonalen Dicken am Rand neben den Schnittflächen bestimmt oder auf eventuell angefertigte Zweitproben zurückgegriffen.

DTI bei höheren Feldstärken und somit deutlich höheren lokalen Auflösungen konnte Korrelationen zwischen FA, den Eigenvektoren und der im Elektronenmikroskop erfassten Kollagenfaserorientierung feststellen.¹³³ Im Rahmen dieser Arbeit wird in Anbetracht der reduzierten Auflösung auf einen direkten Vergleich von MRT und REM verzichtet, die REM diente hier der Darstellung einer intakten Knorpelintegrität durch Messung der zonalen Schichtdicken. Zudem wird auf Änderungen der zonalen Zusammensetzung mit zunehmendem Alter eingegangen.

6.2.4 Diskussion der Wassergehaltsbestimmung

Der Grad der Hydratation des Knorpels kann Rückschlüsse auf die Integrität des Kollagenfasernetzwerkes und den Proteoglykangehalt zulassen. Bereits in einem relativ frühen Stadium der Arthrose kommt es, bedingt durch die Auffaserung des Kollagens, zu einer intrakartilaginären Zunahme des Wassergehalts.¹³⁴

Da hyaliner Knorpel außerhalb seiner natürlichen Umgebung mit Synovialflüssigkeit schnell austrocknet, wurde während allen Arbeitsschritten darauf geachtet, eine regelmäßige Hydrierung der Knorpeloberfläche zu erhalten. Während und nach der MRT-Messung waren die Patellae jederzeit mit NaCl angefeuchtet und mit Klarsichtfolie eingewickelt, um ein Austrocknen zu verhindern. Um Gefrierschäden zu vermeiden, wurde vor Entnahme der Bohrproben auf das Einfrieren der Patellae verzichtet und diese sofort weiterverarbeitet. Durch ständige Spülung des Bohrzylinders mit gekühlter Kochsalzlösung wurde das Risiko einer Austrocknung durch die entstehende Reibungswärme minimiert.

¹³³ Raya JG et al, 2011

¹³⁴ Burstein D et al., 2000

6.3 Diskussion der Ergebnisse

6.3.1 Diskussion der Ergebnisse der Grauwertanalyse

Die Grauwertanalyse der Safranin-O-Färbung dient als semiquantitative Bestimmung des Glykosaminoglykangehalts. Eine Abnahme des Grauwerts von der Knorpeloberfläche zum Tide Mark hin ist hierbei einer Zunahme des GAG-Gehalts gleichzusetzen.

Venn und Maroudas konnten bereits 1977 zeigen, dass der GAG-Gehalt zunimmt, je tiefer man in den Knorpel eindringt. Dies konnte unter anderem von Bayliss et al. bestätigt werden.¹³⁵ Auch in dieser Arbeit zeigt sich eine abfallende GWA-Kurve von der Knorpeloberfläche bis hin zur Knorpel-Knochen-Grenze, was einem Anstieg der GAG-Konzentration von der Gelenkfläche aus bis in die Tiefe entspricht. Dieser typische Verlauf ist auch als Ursache zu sehen für die signifikant höheren Grauwerte in Layer 1 gegenüber Layer 2.

Auch das hier in nahezu allen Proben beobachtete kurzstreckige Abfallen der Proteoglykankonzentration unmittelbar vor Erreichen des Tide Marks wurde bereits mehrfach in histologischen Arbeiten vorbeschrieben.¹³⁶

Das Auftreten degenerativer Veränderung führt durch eine Verkürzung der Hyaluronsäuremoleküle zu einer Abnahme des Proteoglykangehalts.¹³⁷ Dieser Verlust des Proteoglykans verhält sich hierbei indirekt proportional zu dem Ausmaß der Degeneration.¹³⁸ In der älteren Gruppe B war demzufolge eine Zunahme der Grauwerte zu erwarten. Dies trat jedoch nur in den oberflächlichen Feldern 1 bis 3 auf. Hier zeigte sich in Gruppe B im Mittel ein nicht signifikant niedrigerer Proteoglykangehalt der oberflächlichen Knorpelregionen als in der jungen Vergleichsgruppe A, was durchaus vereinbar ist mit einer an der Knorpeloberfläche beginnenden Degeneration.

Im Bereich der Radiärzone jedoch zeigte Gruppe B sogar eine stärkere Anfärbbarkeit mit Safranin-O als Gruppe A. Dieses Phänomen ist so nicht in der

¹³⁵ Venn M et al.; Bayliss MT et al., 1983

¹³⁶ Kirivanta I et al., 1985; Venn MF, 1978

¹³⁷ Moskowitz RW et al, 1979

¹³⁸ Mankin HJ et al., 1979

Literatur vorbeschrieben, ein mögliche Ursache hierfür könnte gegebenenfalls in der beobachteten Auflockerung der Kollagenfaserarchitektur vor allem in der Radiärzone älterer Patellae begründet sein, welche in der Rasterelektronenmikroskopie beobachtet werden konnte. Je weiter der Raum zwischen den Kollagenfibrillen ist, umso besser kann sich das verbliebene Proteoglykan entfalten. Somit werden mehr freie negative Ladungen zur Verfügung gestellt¹³⁹, wodurch gegebenenfalls die Bindung von Safranin-O zunehmen kann.

Dennoch kann von einem tendenziell abnehmenden Glykosaminoglykangehalt mit zunehmendem Alter ausgegangen werden. Der Linear Fit der nach Alter sortierten Grauwertanalyse (siehe Abbildung 24) zeigt einen Anstieg um 0,1115 Punkten pro Jahr.

6.3.2 Diskussion der Ergebnisse der Rasterelektronenmikroskopie

Die von 2 Untersuchern gemessenen zonalen Schichtdicken entsprechen denen, die auch in der Literatur vorbeschrieben wurden. Gemittelt über alle Patellae nahm die Tangentialzone $4,4 \pm 2,4\%$ des Gesamtknorpels in Anspruch, was den vorbeschriebenen $2,4\%$ durchaus entspricht.¹⁴⁰ Die Transitionalzone wurde in dieser Arbeit mit $35,6 \pm 10,6\%$ gemessen, die Radiärzone mit $60,0 \pm 12,0\%$. Raya JG et al. hatten eine Dicke der Transitionalzone von $43,3 \pm 15,3\%$ gesehen, die Radiärzone erreichte $54,7 \pm 14,8\%$.

Wie zu erwarten war, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den zonalen Höhen männlicher und weiblicher Präparaten dargestellt werden. Hierfür gibt es auch keinen Anhalt in vorbestehenden Veröffentlichungen.

Die Radiärzone kam in Gruppe B mit 67% knapp nicht signifikant ($p=0,07$) dicker zur Darstellung als in Gruppe A ($57,0\%$). Es gibt keinerlei Daten bezüglich einer Zunahme der Dicke der Radiärzone mit zunehmendem Alter oder Degeneration. Eine mögliche Ursache für diese Beobachtung könnte gegebenenfalls in der

¹³⁹ Rosenberg L et al, 1974

¹⁴⁰ Raya JG et al., 2011

subjektiv beobachteten Auflockerung der Kollagenfaserstruktur in der Tiefe darstellen. Die breiteren Räume zwischen den Kollagenfasern vereinfachten es uns, die zonalen Grenzen zu bestimmen. Möglicherweise sind diese größeren Räume ein Indiz für die vermehrte Aufnahme von Wasser in den Knorpel bei zunehmender Degeneration.

6.3.3 Diskussion der Ergebnisse der Wassergehaltsbestimmung

Durch Degeneration der Proteoglykane und der Kollagenfaserarchitektur entstehen nach gängiger Theorie mehr freie negative Ladungen im hyalinen Gelenkknorpel, wodurch es zum Anstieg des osmotischen Drucks kommt und der Knorpel zu schwellen beginnt.¹⁴¹

In dieser Arbeit konnte nur ein geringer Anstieg des Wassergehalts mit zunehmendem Alter und anzunehmender Degeneration nachgewiesen werden. Das Gesamtgewicht der Gruppe A verringerte sich um 72,3% während der Trocknung, wohingegen Gruppe B einen nicht signifikant höheren Wassergehalt von 72,5% aufwies. Beide Werte liegen im oberen Bereich des in der Literatur angegebenen Wassergehalts von 60 bis 75%.¹⁴²

5.3.4 Diskussion der Ergebnisse der Diffusions-Tensor-Bildgebung

Es gibt bis dato keine Studie, welche Diffusion-Tensor-Imaging von humanem Knorpel an weit verbreiteten 1,5 Tesla-MR-Scannern beschreibt. Demnach existieren keinerlei Vergleichswerte bezüglich ADC oder FA, sodass wir als Anhaltspunkt auf DTI-Studien an Hochfeld-MR-Scannern zurückgreifen müssen:

¹⁴¹ Calvo E et al., 2001

¹⁴² Maroudas A et al., 1983; Standring S, 2004

Diese Arbeit wies einen mittleren ADC von $1,02 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ auf. In der oberflächennahen Knorpelhälfte lag der ADC zwischen $0,88 \times 10^{-3}$ und $1,82 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ (MW: $1,25 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$).

Meder et al erzielten bei 4,7 Tesla Feldstärke an der Knorpeloberfläche einen ADC von 1,80 bis $1,96 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$. Eine andere Studie bei 17,6 Tesla lieferte einen mittleren ADC von $1,30 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$.¹⁴³

In dieser Arbeit lieferte die tiefe Knorpelhälfte Werte zwischen 0,49 und $1,13 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ (MW: $0,71 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$).

Bei 4,7 Tesla konnte mit $0,97$ bis $1,08 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ knochennah ein etwas höherer Wert gemessen werden, Raya JG et al. erhielten jedoch bei 17,6 Tesla Feldstärke $0,72 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ in der Nähe des Tide Mark¹⁴⁴, was sich nur in geringem Maße von unseren Werten unterscheidet.

Raya et al konnten diese Werte in vivo an einem 7,0 Tesla Gerät an gesunden Probanden verifizieren: An der Oberfläche konnte ein ADC von durchschnittlich $1,21 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ gemessen werden, in der Tiefe $0,75 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$.¹⁴⁵

Somit liegt der ADC bei 1,5 Tesla in etwa in der Größenordnung wie der ADC bei höheren Feldstärken.

Wie auch in anderen Studien konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der ADC an der Knorpeloberfläche signifikant ($p < 0,001$) höher ist als in den tiefen Zonen.¹⁴⁶ Hierbei unterschieden sich die männlichen Proben nur unwesentlich und nicht signifikant von den weiblichen.

Bei zunehmendem Alter ist von einer beginnenden Degeneration und infolgedessen von einem Verlust an Proteoglykan auszugehen.¹⁴⁷ Ein geringerer Proteoglykangehalt bedingt eine schwächere Behinderung der freien Diffusion von Wassermolekülen, sodass der zu erwartende ADC höher sein müsste, als bei

¹⁴³ Meder R et al., 2006; Raya JG et al., 2011

¹⁴⁴ Meder R et al., 2006; Raya JG et al., 2011

¹⁴⁵ Raya JG et al., 2011

¹⁴⁶ de Visser SK, 2006; Deng C et al., 2007

¹⁴⁷ Mankin HJ et al., 1979

intaktem Knorpel. Dies konnte bereits in vitro im Rahmen von Studien belegt werden.¹⁴⁸

Diese Arbeit zeigt jedoch ein widersprüchliches Ergebnis: In Gruppe B, welche sich aus älteren Patellae zusammensetzt, wurden niedrigere ADC-Werte als in jungem Knorpel (Gruppe A) gemessen.

Möglicherweise ist dies der geringen Anzahl an Proben in Gruppe B geschuldet. So ist zu vermuten, dass es sich bei den acht Stück nicht um eine repräsentative Stichprobe handelte. Diese Vermutung lässt sich unterstreichen mit der Tatsache, dass Gruppe B auch bei der Grauwertanalyse in den Feldern 5 bis 9 keine höheren Werte als Gruppe A annimmt. Es besteht also die Möglichkeit, dass in dieser Stichprobe tatsächlich ein höherer Proteoglykangehalt vorlag, als im Durchschnitt zu erwarten ist.

Ein niedriger FA-Wert spricht für ein isotropes Gewebe, die Diffusion wird in alle Richtungen auf gleiche Weise beeinträchtigt. Im hyalinen Knorpel wird sie vor allem von der Organisation der Kollagenfasern beeinflusst.¹⁴⁹ Eine mittlere FA von 0,39 über den gesamten Knorpel konnte gemessen werden, in der oberflächlichen Knorpelhälfte errechnet sich ein Wert von 0,35. Der Mittelwert in Layer 2 liegt mit 0,43 signifikant ($p < 0,01$) höher. Ähnliche Werte erhielten Raya JG et al. bei 7,0 Tesla in gesunden Probanden (0,22 an der Oberfläche, 0,41 in der Nähe des Tide Marks).¹⁵⁰ Die zunehmende Tendenz der FA von der Oberfläche bis hin zur Knorpel-Knochen-Grenze konnte bei 17,6 Tesla bestätigt werden.¹⁵¹

Der höheren FA in Layer 2 liegt vermutlich die Tatsache zugrunde, dass Layer 2 vollständig innerhalb der Radiärzone liegt, welche durch die regelmäßige Anordnung der Kollagenfasern eine höhere Anisotropie besitzt.

Die FA in Gruppe B liegt im Mittel nur unwesentlich und nicht signifikant unter der FA, welche in Gruppe A ermittelt werden konnte. Bei höheren Feldstärken ergaben sich diesbezüglich unterschiedliche Ergebnisse. Raya JG et al. konnten bei zunehmender

¹⁴⁸ Raya JG et al., 2013

¹⁴⁹ Filidoro L, 2011; de Visser SK et al., 2007; Raya JG et al., 2011

¹⁵⁰ Raya JG et al., 2012

¹⁵¹ Raya JG et al., 2013

Degeneration ein Abfallen der FA beobachten, wohingegen Meder keine Änderung der FA im Arthrose-Modell bemerkte.¹⁵²

Dies liegt vermutlich weitestgehend an der Tatsache, dass die FA kaum durch den Proteoglykangehalt beeinflusst wird¹⁵³, sondern eher von der Kollagenverteilung abhängt, welche sich im Rahmen der arthrotischen Degeneration allenfalls geringgradig verändert.

Anzumerken ist, dass in weiblichen Proben eine nicht signifikant höhere FA festgestellt werden konnte als in männlichen. Möglicherweise ist auch hier das Ergebnis durch die geringe Anzahl weiblicher Patellae verzerrt.

Zudem muss erwähnt werden, dass bei einer Matrix-Größe von 128 x 128 Voxel und einem FOV von 140 x 140 mm² die Kantenlänge eines Voxels 1,1 mm beträgt. Bei Knorpeldicken von nur wenigen Millimetern wird die gesamte Knorpeldicke teilweise nur durch drei bis vier Voxel dargestellt. Zur exakteren Darstellung wäre hier eine höhere Auflösung wünschenswert. Somit könnten auch die lokalen Unterschiede des ADC und der FA in den jeweiligen Knorpeltiefen exakter betrachtet werden.

Des Weiteren ist belegt, dass der ADC vor allem im Bereich der Knorpeloberfläche stark artefaktanfällig ist.¹⁵⁴ Aufgrund der reduzierten Auflösung dürften vor allem Partialvolumeneffekte eine nicht zu vernachlässigende Rolle innerhalb dieser Arbeit spielen.

6.3.5 Diskussion der Korrelation von Grauwertanalyse und DTI

Anhand des Streudiagramms kann eine signifikante Korrelation ($p < 0,01$) zwischen der Grauwert-Analyse und dem mittleren ADC nachgewiesen werden. Die Regressionsgeraden zeigen, dass mit zunehmendem Grauwert, was einem fallenden Proteoglykangehalt entspricht, der ADC ansteigt. Diese Korrelation wird in Abbildung 38, welche durch die Unterteilung in einzelne Layer genauer auflöst, deutlich. Ein Anstieg des ADC bei fallendem Proteoglykangehalt konnte schon in mehreren

¹⁵² Raya JG et al., 2013; Meder R et al., 2006

¹⁵³ Raya JG et al., 2011

¹⁵⁴ Raya JG et al., 2011

Studien so beobachtet werden.¹⁵⁵ Burstein D et al. jedoch zeigten 1993, dass die mittlere Diffusion nach enzymatischer Andauung des hyalinen Knorpels mit Trypsin abnahm.¹⁵⁶

Als Kritikpunkt dieses Ergebnisses sei erwähnt, dass die histologische Auswertung aus nur 6 mm durchmessenden Knorpel-Knochen-Zylindern angefertigt wurde. Verglichen wurde allerdings mit den Diffusions-Tensor-Daten, welche Mittelwerte nahezu des gesamten Retropatellarknorpels darstellen. Jedoch dürfte dies die einzige Möglichkeit sein, den PG-Gehalt in unterschiedlichen Knorpeltiefen bestimmen zu können.

In dieser Arbeit wurde der Knorpel in die oberflächliche Hälfte (Layer 1) und die knochennahe Hälfte (Layer 2) unterteilt, was der relativ niedrigen lokalen Auflösung geschuldet war. Diese Unterteilung spiegelt jedoch nicht den natürlichen zonalen Aufbau des Knorpels dar. Wie die Elektronenmikroskopie zeigt, erstreckt sich die Radiärzone häufig über mehr als 50 % des gesamten Knorpels. Das akquirierte Signal aus Layer 1 wird somit von Tangential-/Transitional- und Radiärzone beeinflusst. Andere Studien konnten eine exaktere Aufteilung des Knorpels in der Tiefe durch Erhöhung der Auflösung erreichen, indem man sich der Hochfeld-MR-Technik bei mindestens 3 Tesla, meist sogar 7 Tesla Feldstärke bediente.¹⁵⁷

¹⁵⁵ Deng X et al., 2007; Raya JG et al., 2011

¹⁵⁶ Burstein D et al., 1993

¹⁵⁷ Raya JG et al., 2012

7. Ausblick und alternative Messtechniken

Die Magnetresonanztomographie unterliegt einer sehr schnellen Entwicklung, die technischen Möglichkeiten nehmen beständig zu. Eine Vielzahl neuer Techniken wurde in den letzten Jahren entwickelt, darunter unter anderem Ganzkörperscanner mit 3 bis 7 Tesla Feldstärke, welche es erlauben, Bilder in höheren Auflösungen bei reduzierter Akquisitionsdauer zu erstellen.

Neue Messmethoden werden ausgearbeitet, um Knorpelschäden noch früher und detaillierter darstellen zu können. T1rho-Mapping, welches die langsamen Bewegungsinteraktionen zwischen Wassermolekülen bestimmt, scheint Rückschlüsse auf den Gehalt an großen Makromolekülen, wie Proteoglykan und Kollagen, schließen zu lassen. Hierfür werden T1-Relaxationszeiten in einem rotierenden Koordinatensystem benötigt, welche mithilfe der Spinlock-Technik akquiriert werden.¹⁵⁸ Von Nachteil ist bei dieser Methode ein hoher SAR-Wert (Specific Absorption Rate) und eine mögliche Erhitzung des Gewebes durch starke RF-Pulse (Radiofrequenz).¹⁵⁹

Eine weitere Methode, die dGEMRIC, gibt anhand eines Index auf Basis von T1-Maps indirekt Hinweise auf ein erhöhtes Arthroserisiko, zum Teil bereits bevor röntgenologisch Anzeichen einer manifesten Arthrose nachweisbar sind.¹⁶⁰ Jedoch ist für dieses Verfahren die Applikation eines gadoliniumhaltigen Kontrastmittels nötig, was mögliche Risiken wie anaphylaktische Reaktionen oder die nephrogene systemische Fibrose mit sich bringt.

Auch scheinen ²³Na-Imaging und gagCEST (GlycosAminoGlycan concentration by Chemical Exchange-dependent Saturation Transfer) Hinweise auf den GAG-Gehalt des hyalinen Knorpels zu liefern, doch auch diese Methoden sind teilweise stark

¹⁵⁸ Duvvuri U et al., 1997

¹⁵⁹ Pedersen DR et al., 2011

¹⁶⁰ Borthakur A et al., 2006, Owman H et al., 2008

anfällig für Partialvolumeneffekte und zudem bis jetzt nur an Hochfeld-MRT (7 Tesla) erprobt.¹⁶¹

In den letzten Jahren wurde auch die Diffusions-Tensor-Bildgebung weiter verfeinert, Raya et al. konnten in vivo an 7-Tesla-MR-Scannern signifikant erhöhte ADC-Werte und erniedrigte FA-Werte bei Patienten mit klinisch nachgewiesener Arthrose feststellen. Die Akquisitionszeit konnte hierbei auf etwa 3 Minuten reduziert werden, was es einfacher macht, die DTI im klinischen Alltag an Patienten anzuwenden.

In Zukunft sind somit frühe Degenerationsprozesse womöglich klarer darstellbar, als etwa mit der Messung der T2-Relaxationszeiten.¹⁶² Momentan ist man noch auf der Suche nach Grenzwerten, um gesunden von beginnend degeneriertem Knorpel abgrenzen zu können.

Die Diffusions-Tensor-Bildgebung besitzt sicherlich das Potenzial, in Zukunft bei der Frühdiagnose der Gelenkarthrose eine entscheidende Rolle zu spielen.

¹⁶¹ Ling W et al., 2008; Schmitt B et al., 2011

¹⁶² Raya JG et al., 2011

8. Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit der Diffusions-Tensor-MRT, einer Technik, die es ermöglicht Aussagen über die Richtung der Diffusion von Wassermolekülen in Gewebe zu treffen. Sie erlaubt uns damit, feinste anatomische Strukturen des hyalinen Gelenkknorpels darzustellen und besitzt möglicherweise das Potenzial, bereits frühe, auf molekularer Ebene stattfindende, degenerative Veränderungen des hyalinen Gelenkknorpels zu erkennen. Erste Studien konnten bereits zeigen, dass bei höheren Feldstärken Zusammenhänge zwischen den durch MRT gemessenen Diffusionskoeffizienten und dem Proteoglykangehalt des Knorpels, welcher als Marker für die Intaktheit gilt, bestehen.¹⁶³

Aktuell liegen jedoch keinerlei Daten vor, wie sich hyaliner Gelenkknorpel in der DTI bei 1,5 Tesla Feldstärke mit Routinespulen, wie sie in Deutschland wohl am weitesten verbreitet sind, verhält.

Zudem gelang es, durch die Verwendung frisch entnommener, humaner Leichenpatellae, erstmalig DTI-Daten des gesamten Retropatellarknorpels mit den histologisch-anatomischen Gegebenheiten zu korrelieren und somit Aussagen über die Auswirkung des tatsächlichen Proteoglykangehaltes und der Kollagenfaserarchitektur auf das daraus resultierende Kernspinsignal treffen.

Im Anschluss an die MRT-Untersuchung wurden, durch ein semiquantitatives Verfahren, der Gehalt und die Verteilung der Glykosaminoglykane bestimmt, welche eine bedeutende Rolle in der Zusammensetzung der Knorpelmatrix spielen.

Die Integrität der Kollagenfaserarchitektur wurde im Rasterelektronenmikroskop sichergestellt, zudem wurde der Wassergehalt des Knorpels bestimmt.

Das Ergebnis der Mittelwertberechnung des ADC (Apparent Diffusion Coefficient) über alle Patellae lieferte einen Wert von $1,02 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$. Der ADC-Wert nahm in

¹⁶³ Raya JG et al., 2013

unserer Stichprobe durchschnittlich um $0,0044 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ pro Jahr (entspricht dem Sterbealter) ab. Im Bereich der oberflächlichen Knorpelhälfte (Layer 1) zeigten sich signifikant höhere Werte als in den tiefen Schichten (Layer 2).

Oberflächennah ergaben sich signifikant niedrigere FA-Werte als in den tieferen Knorpelregionen, im Mittel konnte eine Fraktionelle Anisotropie von 0,388 errechnet werden.

Die Grauwertanalyse zeigte, dass auch der Proteoglykangehalt von der Knorpeloberfläche bis in die knochennahen Schichten stetig zunimmt, was den Daten früherer Arbeiten entspricht. Jedoch konnte kein signifikantes Abfallen der Proteoglykankonzentration mit zunehmendem Alter gesehen werden.

Weder die DTI-Parameter noch die Grauwertanalyse oder die Bestimmung der Dicke der zonalen Schichten mithilfe des Rasterelektronenmikroskops konnten Hinweise auf Unterschiede in der Zusammensetzung von männlichem und weiblichem Knorpel liefern.

Eine signifikante Korrelation zwischen dem Proteoglykangehalt des Knorpels und dem ADC konnte in verschiedenen Knorpeltiefen nachgewiesen werden. Dies bestätigte sich bei einem Bestimmtheitsgrad (R^2) von 0,163 und einem p-Wert von 0,006.

Somit zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Diffusionssignal der Magnetresonanztomographie und dem Proteoglykangehalt.

Es konnte gezeigt werden, dass mit der Diffusibilität und der Fraktionellen Anisotropie (FA) zwei Parameter der Diffusions-Tensor-Bildgebung auch bei einer Feldstärke von 1,5 Tesla Werte liefern, die in einer ähnlichen Größenordnung liegen, wie sie in der Literatur im Hochfeld-MRT vorbeschrieben wurden.¹⁶⁴ Auch das Verhalten des ADC und der FA in oberflächlichem Knorpel und in tieferen Regionen zeigt einen ähnlichen Verlauf.

¹⁶⁴ Raya JG et al., 2013; Meder R et al., 2006

Somit ist DTI auch abseits von experimentellen Studien an Hochfeld-Magnetresonanztomographen mit bis zu 17,6 Tesla Feldstärke, anwendbar. Sie ermöglicht es in vitro eine valide Aussage zur mikrostrukturellen Zusammensetzung des Gelenkknorpels zu treffen.

Die Diffusions-Tensor-MRT bietet zudem im Vergleich zur herkömmlichen Schnittbilddiagnostik den Vorteil einer Quantifizierbarkeit, sodass wir, ausgehend von einer messbaren Größe, wie zum Beispiel dem ADC, Aussagen über die Integrität des Knorpels und seiner Proteoglykanverteilung treffen können.

Dadurch stellen diese Daten zugleich eine wichtige Grundlage für die Anwendung neuerer, technisch weiterentwickelter und hochauflösender Methoden dar.

Hierfür bedient sich die aktuelle Forschung optimierter DTI-Sequenzen mit höheren Feldstärken zwischen 3 Tesla und 7 Tesla. Diese ermöglichen es, in-vivo DTI mit höherer lokaler Auflösung, geringerem Signal-zu-Rausch-Verhältnis und kürzeren Akquisitionszeiten durchzuführen.

Die Diffusions-Tensor-Bildgebung besitzt somit das Potential, in Zukunft eine Rolle in der strahlungsfreien Frühdiagnostik der Kniegelenkarthrose einnehmen zu können.

9. Literaturverzeichnis

Aigner T, Hemmel M, Neureiter D, Gebhard PM, Zeiler G, Kirchner T, McKenna L: Apoptotic cell death is not a widespread phenomenon in normal aging and osteoarthritis human articular knee cartilage: a study of proliferation, programmed cell death (apoptosis), and viability of chondrocytes in normal and osteoarthritic human knee cartilage. *Arthritis Rheum.* 2001 Jun;44(6): S.1304-1312. (2001)

Ando W, Fujie H, Moriguchi Y, Nansai R, Shimomura K, Hart DA, Yoshikawa H, Nakamura N: Detection of abnormalities in the superficial zone of cartilage repaired using a tissue engineered construct derived from synovial stem cells. *Eur Cell Mater.* 2012 Sep 28;24: S.292-307 (2012)

Arden N, Nevitt MC: Osteoarthritis: epidemiology. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2006 Feb;20(1): S.3-25 (2006)

Aumüller G, Aust G, Doll A et al.: *Duale Reihe – Anatomie*, 1.Auflage. Stuttgart: Thieme Verlag, 2006, S.41-49. (2006)

Bashir A, Gray ML, Hartke J, Burstein D: Nondestructive imaging of human cartilage glycosaminoglycan concentration by MRI. *Magn Reson Med.* 1999 May;41(5): S.857-865. (1999)

Basser PJ, Mattiello J, LeBihan D. MR diffusion tensor spectroscopy and imaging. *Biophys J.* 1994 Jan;66(1): S.259-267. (1994)

Basser PJ, Pierpaoli C: A simplified method to measure the diffusion tensor from seven MR images. *Magn Reson Med.* 1998 Jun;39(6): S.928-934. (1998)

Bayliss MT, Venn M, Maroudas A, Ali SY: Structure of proteoglycans from different layers of human articular cartilage. *Biochem J.* 1983 Feb 1;209(2): S.387-400. (1983)

Behr VC, Weber T, Neuberger T, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Haase A, Jakob PM, Faber C: High-resolution MR imaging of the rat spinal cord in vivo in a wide-bore magnet at 17.6 Tesla. *MAGMA*. 2004 Dec;17(3-6): S.353-358. (2004)

Benninghoff A: Spaltlinien am Knochen, eine Methode zur Ermittlung der Architektur platter Knochen. *Verhandl. Anat. Ges.* 34: S.189-206 (1925)

Benninghoff, A, Drenckhahn, D: Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Band 1, 17. Auflage. München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 2008, S.128-132. (2008)

Borthakur A, Mellon E, Niyogi S, Witschey W, Kneeland JB, Reddy R: Sodium and T1rho MRI for molecular and diagnostic imaging of articular cartilage. *NMR Biomed.* 2006 Nov;19(7): S.781-821. (2006)

Bos PK, DeGroot J, Budde M, Verhaar JA, van Osch GJ: Specific enzymatic treatment of bovine and human articular cartilage: implications for integrative cartilage repair. *Arthritis Rheum.* 2002 Apr;46(4): S.976-985. (2002)

Brighton CT, Kitajima T, Hunt RM: Zonal analysis of cytoplasmic components of articular cartilage chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 1984 Nov;27(11): S.1290-1299. (1984)

Broom ND, Marra DL: New structural concepts of articular cartilage demonstrated with a physical model. *Connect Tissue Res.* 1985;14(1): S.1-8. (1985)

Brown R: A brief account of microscopical observations made in the months of June, July and August, 1827, on the particles contained in the pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies. *Phil. Mag.* 4, S.161–173 (1828)

Buckwalter JA, Roughley PJ, Rosenberg LC: Age-related changes in cartilage proteoglycans: quantitative electron microscopic studies. *Microsc Res Tech.* 1994 Aug 1;28(5): S.398-408. (1994)

Buckwalter JA, Mankin HJ: Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect.* 1998;47: S.477-486. (1998)

Buckwalter JA, Mankin HJ: Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect.* 1998;47: S.487-504. (1998)

Bulstra SK, Drukker J, Kuijer R, Buurman WA, van der Linden AJ: Thionin staining of paraffin and plastic embedded sections of cartilage. *Biotech Histochem.* 1993 Jan;68(1): S.20-28. (1993)

Burstein D, Gray ML, Hartman AL, Gipe R, Foy BD: Diffusion of small solutes in cartilage as measured by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and imaging. *J Orthop Res.* 1993 Jul;11(4): S.465-478. (1993)

Burstein D, Bashir A, Gray ML: MRI techniques in early stages of cartilage disease. *Invest Radiol.* 2000 Oct;35(10): S.622-638. (2000)

Byers PD, Contepomi CA, Farkas TA: A post mortem study of the hip joint. Including the prevalence of the features of the right side. *Ann Rheum Dis.* 1970 Jan;29(1): S.15-31. (1970)

Camplejohn KL, Allard SA: Limitations of safranin 'O' staining in proteoglycan-depleted cartilage demonstrated with monoclonal antibodies. *Histochemistry.* 1988;89(2): S.185-188. (1988)

Calvo E, Palacios I, Delgado E, Ruiz-Cabello J, Hernández P, Sánchez-Pernaute O, Egido J, Herrero-Beaumont G: High-resolution MRI detects cartilage swelling at the early stages of experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2001 Jul;9(5): S.463-472. (2001)

Cha MH, Do SH, Park GR, Du P, Han KC, Han DK, Park K: Induction of Re-Differentiation of Passaged Rat Chondrocytes Using a Naturally Obtained Extracellular Matrix Microenvironment. *Tissue Eng Part A.* 2013 Jan 5. [Epub ahead of print] (2013)

Chan DD, Neu CP: Probing articular cartilage damage and disease by quantitative magnetic resonance imaging. *J R Soc Interface*. 2013 Jan 6;10(78):20120608. (2012)

Conaghan PG, Dickson J, Grant RL; Guideline Development Group: Care and management of osteoarthritis in adults: summary of NICE guidance. *BMJ*. 2008 Mar 1;336(7642): S.502-503. (2008)

De Visser SK, Bowden JC, Wentrup-Byrne E, Rintoul L, Bostrom T, Pope JM, Momot KI: Anisotropy of collagen fibre alignment in bovine cartilage: comparison of polarised light microscopy and spatially resolved diffusion-tensor measurements. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008 Jun;16(6): S.689-697. (2008)

Dardzinski BJ, Mosher TJ, Li S, Van Slyke MA, Smith MB: Spatial variation of T2 in human articular cartilage. *Radiology*. 1997 Nov;205(2): S.546-550. (1997)

Del-Manso P, Fry M, Todd-Pokropek A: Clinical MR Evaluation of Early Stage Articular Cartilage Disease. Abstract for the 12th Annual Conference on Medical Image Understanding and Analysis 2008, 2nd – 3rd July 2008, Dundee, Scotland (2008)

Deng X, Farley M, Nieminen MT, Gray M, Burstein D: Diffusion tensor imaging of native and degenerated human articular cartilage. *Magn Reson Imaging*. 2007 Feb;25(2): S.168-171. (2007)

Dietrich O, Raya JG, Reeder SB, Reiser MF, Schoenberg SO: Measurement of signal-to-noise ratios in MR images: influence of multichannel coils, parallel imaging, and reconstruction filters. *J Magn Reson Imaging*. 2007 Aug;26(2): S.375-385. (2007)

Ding C, Cicuttini F, Scott F, Cooley H, Jones G. Association between age and knee structural change: a cross sectional MRI based study. *Ann Rheum Dis*. 2005 Apr;64(4): S.549-555. (2005)

Duvvuri U, Reddy R, Patel SD, Kaufman JH, Kneeland JB, Leigh JS. T1rho-relaxation in articular cartilage: effects of enzymatic degradation. *Magn Reson Med.* 1997 Dec;38(6): S.863-867. (1997)

Ficat C, Maroudas A. Cartilage of the patella. Topographical variation of glycosaminoglycan content in normal and fibrillated tissue. *Ann Rheum Dis.* 1975 Dec;34(6): S.515-519. (1975)

Filidoro L, Dietrich O, Weber J, Rauch E, Oerther T, Wick M, Reiser MF, Glaser C. High-resolution diffusion tensor imaging of human patellar cartilage: feasibility and preliminary findings. *Magn Reson Med.* 2005 May;53(5): S.993-998. (2005)

Filidoro L: Ultra-high field magnetic resonance diffusion tensor imaging of the hyaline articular cartilage. Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München, 2011

Fragonas E, Mlynárik V, Jellús V, Micali F, Piras A, Toffanin R, Rizzo R, Vittur F: Correlation between biochemical composition and magnetic resonance appearance of articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 1998 Jan;6(1): S.24-32. (1998)

Frank LR, Wong EC, Luh WM, Ahn JM, Resnick D. Articular cartilage in the knee: mapping of the physiologic parameters at MR imaging with a local gradient coil--preliminary results. *Radiology.* 1999 Jan;210(1): S.241-246. (1999)

Glaser C, Trumm C, Scheidler J, Heuck A: Meniscus and ligament injuries. *Radiologe.* 2006 Jan;46(1): S.26-35. (2006)

Goldring MB, Otero M, Tsuchimochi K, Ijiri K, Li Y: Defining the roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism. *Ann Rheum Dis.* 2008 Dec;67 Suppl 3:iii S.75-82. (2008)

Gruber CE, Capuani S, Giulietti G, Gili S, Maraviglia B: High-resolution DTI to study articular cartilage dehydration. Proceedings 18th Scientific Meeting ISMRM, Stockholm, Schweden (2010)

Grushko G, Schneiderman R, Maroudas A: Some biochemical and biophysical parameters for the study of the pathogenesis of osteoarthritis: a comparison between the processes of ageing and degeneration in human hip cartilage. *Connect Tissue Res.* 1989;19(2-4): S.149-176 (1989)

Gylys-Morin VM, Hajek PC, Sartoris DJ, Resnick D: Articular cartilage defects: detectability in cadaver knees with MR. *AJR Am J Roentgenol.* 1987 Jun;148(6): S.1153-1157 (1987)

Hancock CM, Riegger-Krugh C: Modulation of pain in osteoarthritis: the role of nitric oxide. *Clin J Pain.* 2008 May;24(4): S.353-365. (2008)

Hedlund H, Mengarelli-Widholm S, Reinholt FP, Svensson O. Stereologic studies on collagen in bovine articular cartilage. *APMIS.* 1993 Feb;101(2): S.133-140. (1993)

Henkelman RM, Stanisz GJ, Kim JK, Bronskill MJ. Anisotropy of NMR properties of tissues. *Magn Reson Med.* 1994 Nov;32(5): S.592-601. (1994)

Henrotin YE, Bruckner P, Pujol JP. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2003 Oct;11(10): S.747-755. (2003)

Hunter DJ, Guermazi A. Imaging techniques in osteoarthritis. *PM R.* 2012 May;4(5 Suppl): S.68-74. (2012)

Iqbal K, Khan MY, Minhas LA. Effects of immobilisation and re-mobilisation on superficial zone of articular cartilage of patella in rats. *J Pak Med Assoc.* 2012 Jun;62(6): S.531-535. (2012)

Jordan JM, Helmick CG, Renner JB, Luta G, Dragomir AD, Woodard J, Fang F, Schwartz TA, Abbate LM, Callahan LF, Kalsbeek WD, Hochberg MC. Prevalence of knee symptoms and radiographic and symptomatic knee osteoarthritis in African Americans and Caucasians: the Johnston County Osteoarthritis Project. *J Rheumatol.* 2007 Jan;34(1): S.172-180. (2007)

Jubb RW, Eggert FM. Staining of demineralized cartilage. II. Quantitation of articular cartilage proteoglycan after fixation and rapid demineralization. *Histochemistry*. 1981 Dec;73(3): S.391-396. (1981)

Király K, Lapveteläinen T, Arokoski J, Törrönen K, Módis L, Kiviranta I, Helminen HJ. Application of selected cationic dyes for the semiquantitative estimation of glycosaminoglycans in histological sections of articular cartilage by microspectrophotometry. *Histochem J*. 1996 Aug;28(8): S.577-590. (1996)

Kiviranta I, Jurvelin J, Tammi M, Säämänen AM, Helminen HJ. Microspectrophotometric quantitation of glycosaminoglycans in articular cartilage sections stained with Safranin O. *Histochemistry*. 1985;82(3): S.249-255. (1985)

Kummer, B. *Biomechanik*. Köln : Dt. Ärzte-Verl., 2005, S.47-59. (2005)

Kurtz SM, Ong KL, Lau E, Widmer M, Maravic M, Gómez-Barrena E, de Pina Mde F, Manno V, Torre M, Walter WL, de Steiger R, Geesink RG, Peltola M, Röder C. International survey of primary and revision total knee replacement. *Int Orthop*. 2011 Dec;35(12): S.1783-1789. (2011)

Lahm A, Kasch R, Mrosek E, Spank H, Erggelet C, Esser J, Merk H. Semiquantitative analysis of ECM molecules in the different cartilage layers in early and advanced osteoarthritis of the knee joint. *Histol Histopathol*. 2012 May;27(5): S.609-615. (2012)

Lawrence JS, Bremner JM, Bier F. Osteo-arthrosis. Prevalence in the population and relationship between symptoms and x-ray changes. *Ann Rheum Dis*. 1966 Jan;25(1): S.1-24. (1966)

Le Bihan D. Intravoxel incoherent motion imaging using steady-state free precession. *Magn Reson Med* 1988;7: S.346-351 (1988)

Le Bihan D, Turner R, Moonen CTW, Pekar J; „Imaging of Diffusion and Microcirculation with Gradient Sensitization: Design, Strategy, and Significance. *JMRI* 1991 Jan; 1: S.7-28. (1991)

Leeb BF, Latta HJ, Haindl P, Maktari A, Rintelen B: Hyaluronan in der Behandlung der Osteoarthritis des Kniegelenkes - Ergebnisse einer offenen Anwendungsbeobachtung. *J Miner Stoffwechs* 2007; 14 (1): S.32–35. (2007)

Lehner KB, Rechl HP, Gmeinwieser JK, Heuck AF, Lukas HP, Kohl HP. Structure, function, and degeneration of bovine hyaline cartilage: assessment with MR imaging in vitro. *Radiology*. 1989 Feb;170(2): S.495-499. (1989)

Ling W, Regatte RR, Navon G, Jerschow A. Assessment of glycosaminoglycan concentration in vivo by chemical exchange-dependent saturation transfer (gagCEST). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Feb 19;105(7): S.2266-2270. (2008)

Lo CY, Chao YP, Chou KH, Guo WY, Su JL, Lin CP. DTI-based virtual reality system for neurosurgery. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2007; S.1326-1329. (2007)

Loeuille D, Gonord P, Guingamp C, Gillet P, Blum A, Sauzade M, Netter P. In vitro magnetic resonance microimaging of experimental osteoarthritis in the rat knee joint. *J Rheumatol*. 1997 Jan;24(1): S.133-139. (1997)

Loeuille D, Olivier P, Mainard D, Gillet P, Netter P, Blum A. Review: Magnetic resonance imaging of normal and osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum*. 1998 Jun;41(6): S.963-975. (1998)

Loeser RF. Age-related changes in the musculoskeletal system and the development of osteoarthritis. *Clin Geriatr Med*. 2010 Aug;26(3): S.371-386. (2010)

Manenti G, Carlani M, Mancino S, Colangelo V, Di Roma M, Squillaci E, Simonetti G. Diffusion tensor magnetic resonance imaging of prostate cancer. *Invest Radiol*. 2007 Jun;42(6): S.412-419. (2007)

Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am*. 1971 Apr;53(3): S.523-537. (1971)

Mankin HJ. The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis (first of two parts). *N Engl J Med.* 1974 Dec 12;291(24): S.1285-1292. (1974)

Mankin HJ. The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis (second of two parts). *N Engl J Med.* 1974 Dec 19;291(25): S.1335-1340. (1974)

Mankin HJ. Chondrocyte transplantation--one answer to an old question. *N Engl J Med.* 1994 Oct 6;331(14): S.940-941. (1994)

Maroudas AI. Balance between swelling pressure and collagen tension in normal and degenerate cartilage. *Nature.* 1976 Apr 29;260(5554): S.808-809. (1976)

Maroudas A, Bayliss MT, Venn MF. Further studies on the composition of human femoral head cartilage. *Ann Rheum Dis.* 1980 Oct;39(5): S.514-523. (1980)

Maroudas A, Bayliss M, Brocklehurst B, Coysh L, Freeman M, Revell P, Venn M.[Biochemical and physico-chemical studies on osteoarthrosis in relation to some clinical aspects]. *Orthopade.* 1983 Apr;12(2): S.109-118. (1983)

Martin I, Obradovic B, Freed LE, Vunjak-Novakovic G. Method for quantitative analysis of glycosaminoglycan distribution in cultured natural and engineered cartilage. *Ann Biomed Eng.* 1999 Sep-Oct;27(5): S.656-662. (1999)

McArthur BA, Dy CJ, Fabricant PD, Valle AG. Long term safety, efficacy, and patient acceptability of hyaluronic acid injection in patients with painful osteoarthritis of the knee. *Patient Prefer Adherence.* 2012;6: S.905-910. (2012)

McGibbon CA, Trahan CA. Measurement accuracy of focal cartilage defects from MRI and correlation of MRI graded lesions with histology: a preliminary study. *Osteoarthritis Cartilage.* 2003 Jul;11(7): S.483-493. (2003)

Meder R, de Visser SK, Bowden JC, Bostrom T, Pope JM. Diffusion tensor imaging of articular cartilage as a measure of tissue microstructure. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006 Sep;14(9): S.875-881. (2006)

Moskowitz RW, Howell DS, Goldberg VM, Muniz O, Pita JC. Cartilage proteoglycan alterations in an experimentally induced model of rabbit osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1979 Feb;22(2): S.155-163. (1979)

Moussavi-Harami SF, Pedersen DR, Martin JA, Hillis SL, Brown TD. Automated objective scoring of histologically apparent cartilage degeneration using a custom image analysis program. *J Orthop Res.* 2009 Apr;27(4): S.522-528. (2009)

Muir H, Bullough P, Maroudas A. The distribution of collagen in human articular cartilage with some of its physiological implications. *J Bone Joint Surg Br.* 1970 Aug;52(3): S.554-563. (1970)

Murphy L, Schwartz TA, Helmick CG, Renner JB, Tudor G, Koch G, Dragomir A, Kalsbeek WD, Luta G, Jordan JM. Lifetime risk of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2008 Sep 15;59(9): S.1207-1213. (2013)

Oliveria SA, Felson DT, Reed JI, Cirillo PA, Walker AM. Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization. *Arthritis Rheum.* 1995 Aug;38(8): S.1134-1141. (1995)

Orfanidou T, Iliopoulos D, Malizos KN, Tsezou A. Involvement of SOX-9 and FGF-23 in RUNX-2 regulation in osteoarthritic chondrocytes. *J Cell Mol Med.* 2009 Sep;13(9B): S.3186-3194. (2009)

Ostergaard K, Petersen J, Andersen CB, Bendtzen K, Salter DM. Histologic/histochemical grading system for osteoarthritic articular cartilage: reproducibility and validity. *Arthritis Rheum.* 1997 Oct;40(10): S.1766-1771. (1997)

Owman H, Tiderius CJ, Neuman P, Nyquist F, Dahlberg LE. Association between findings on delayed gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging of cartilage and future knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2008 Jun;58(6): S.1727-1730. (2008)

Pearle AD, Warren RF, Rodeo SA. Basic science of articular cartilage and osteoarthritis. *Clin Sports Med.* 2005 Jan;24(1): S.1-12. (2005)

Pedersen DR, Klocke NF, Thedens DR, Martin JA, Williams GN, Amendola A. Integrating cartilage-specific T1rho MRI into knee clinic diagnostic imaging. *Iowa Orthop J.* 2011;31: S.99-109. (2011)

Pierpaoli C, Basser PJ. Toward a quantitative assessment of diffusion anisotropy. *Magn Reson Med.* 1996 Dec;36(6): S.893-906. (1996)

Poole CA. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J Anat.* 1997 Jul;191 (Pt 1): S.1-13. (1997)

Pullig O, Pfander D, Swoboda B: Molecular principles of induction and progression of arthrosis. *Orthopade.* 2001 Nov;30(11): S.825-833. (2001)

Rajabi R, Johnson GM, Alizadeh MH, Meghdadi N. Radiographic knee osteoarthritis in ex-elite table tennis players. *BMC Musculoskelet Disord.* 2012 Feb 6;13:12. Published online; URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-2474/13/12> (2012)

Raya JG, Melkus G, Dietrich O, Filidoro L, Weber D, Reiser MF, Jakob PM, Glaser C. Multiparametric characterization of healthy and diseased cartilage at 17.6 T: Early results. *Proceedings 16th Scientific Meeting ISMRM, Toronto, Canada,* 16:330. (2008)

Raya JG, Horng A, Dietrich O, Krasnokutsky S, Beltran LS, Reiser MF, Recht M, Glaser C: In vivo DTI of articular cartilage: A new set of biomarkers for the early diagnosis of osteoarthritis. *Proceedings 19th Scientific Meeting ISMRM, Montreal, Canada.* (2011)

Raya JG, Arnoldi AP, Weber DL, Filidoro L, Dietrich O, Adam-Neumair S, Mützel E, Melkus G, Putz R, Reiser MF, Jakob PM, Glaser C. Ultra-high field diffusion tensor imaging of articular cartilage correlated with histology and scanning electron microscopy. *MAGMA.* 2011 Aug;24(4): S.247-258. (2011)

Raya JG, Melkus G, Adam-Neumair S, Dietrich O, Mützel E, Kahr B, Reiser MF, Jakob PM, Putz R, Glaser C. Change of diffusion tensor imaging parameters in articular cartilage with progressive proteoglycan extraction. *Invest Radiol.* 2011 Jun;46(6): S.401-409. (2011)

Raya JG, Horng A, Dietrich O, Krasnokutsky S, Beltran LS, Storey P, Reiser MF, Recht MP, Sodickson DK, Glaser C. Articular cartilage: in vivo diffusion-tensor imaging. *Radiology*. 2012 Feb;262(2): S.550-559. (2012)

Raya JG, Melkus G, Adam-Neumair S, Dietrich O, Mützel E, Reiser MF, Putz R, Kirsch T, Jakob PM, Glaser C. Diffusion-Tensor Imaging of Human Articular Cartilage Specimens with Early Signs of Cartilage Damage. *Radiology*. 2012 Dec 13. [Epub ahead of print] (2012)

Rieppo J, Töyräs J, Nieminen MT, Kovanen V, Hyttinen MM, Korhonen RK, Jurvelin JS, Helminen HJ. Structure-function relationships in enzymatically modified articular cartilage. *Cells Tissues Organs*. 2003;175(3): S.121-132. (2003)

Robert Koch-Institut (Hrsg) 2013. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Heft 54, Arthrose; Robert Koch-Institut, Berlin (2013)

Rosenberg L. Chemical basis for the histological use of safranin O in the study of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*. 1971 Jan;53(1): S.69-82. (1971)

Rubenstein JD, Kim JK, Morova-Protzner I, Stanchev PL, Henkelman RM. Effects of collagen orientation on MR imaging characteristics of bovine articular cartilage. *Radiology*. 1993 Jul;188(1): S.219-226. (1993)

Schiebler TH, Korf HW. Anatomie 10. Auflage. Darmstadt : Dr. Dietrich Steinkopff Verlag, 2007: S.46-49. (2007)

Schmitt B, Zbyn S, Stelzeneder D, Jellus V, Paul D, Lauer L, Bachert P, Trattnig S. Cartilage quality assessment by using glycosaminoglycan chemical exchange saturation transfer and ²³Na MR imaging at 7 T. *Radiology*. 2011 Jul;260(1): S.257-264. (2011)

Shimizu C, Coutts RD, Healey RM, Kubo T, Hirasawa Y, Amiel D. Method of histomorphometric assessment of glycosaminoglycans in articular cartilage. *J Orthop Res*. 1997 Sep;15(5): S.670-674. (1997)

Standring, S: Gray's Anatomy, 39th Edition. Elsevier Health Sciences, London, 2004. S.83-86 (2004)

Stejskal EO, Tanner JE: Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient. J. Chem. Phys. **42**: S.288-292 (1965)

Stewart WF, Ricci JA, Chee E, Morganstein D, Lipton R. Lost productive time and cost due to common pain conditions in the US workforce. JAMA. 2003 Nov 12;290(18): S.2443-2454. (2003)

Tallheden T, Brittberg M, Peterson L, Lindahl A. Human articular chondrocytes-- plasticity and differentiation potential. Cells Tissues Organs. 2006;184(2): S.55-67. (2006)

Trattinig S, Mlynárik V, Breitenseher M, Huber M, Zembsch A, Rand T, Imhof H. MRI visualization of proteoglycan depletion in articular cartilage via intravenous administration of Gd-DTPA. Magn Reson Imaging. 1999 May;17(4): S.577-583. (1999)

Uhl M, Ihling C, Allmann KH, Laubenberger J, Tauer U, Adler CP, Langer M. Human articular cartilage: in vitro correlation of MRI and histologic findings. Eur Radiol. 1998;8(7): S.1123-1129. (1998)

Van Breuseghem I. Ultrastructural MR imaging techniques of the knee articular cartilage: problems for routine clinical application. Eur Radiol. 2004 Feb;14(2):184-192. (2004)

Van der Sluijs JA, Geesink RG, van der Linden AJ, Bulstra SK, Kuyser R, Drukker J. The reliability of the Mankin score for osteoarthritis. J Orthop Res. 1992 Jan;10(1): S.58-61. (1992)

Venn M, Maroudas A. Chemical composition and swelling of normal and osteoarthrotic femoral head cartilage. I. Chemical composition. Ann Rheum Dis. 1977 Apr;36(2): S.121-129. (1977)

- Venn MF. Variation of chemical composition with age in human femoral head cartilage. *Ann Rheum Dis.* 1978 Apr;37(2): S.168-174. (1978)
- Vignon E, Arlot M, Patricot LM, Vignon G. The cell density of human femoral head cartilage. *Clin Orthop Relat Res.* 1976 Nov-Dec;(121):303-308. (1976)
- Visco DM, Johnstone B, Hill MA, Jolly GA, Caterson B. Immunohistochemical analysis of 3-B(-) and 7-D-4 epitope expression in canine osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1993 Dec;36(12): S.1718-1725. (1993)
- Wang L, Goldstein FC, Levey AI, Lah JJ, Meltzer CC, Holder CA, Mao H. White matter hyperintensities and changes in white matter integrity in patients with Alzheimer's disease. *Neuroradiology.* 2011 May;53(5): S.373-381. (2011)
- Wang XQ, Lang SY, Hong LU, Lin MA, Yan-ling MA, Yang F. Changes in extratemporal integrity and cognition in temporal lobe epilepsy: a diffusion tensor imaging study. *Neurol India.* 2010 Nov-Dec;58(6): S.891-899. (2010)
- Watrin A, Ruaud JP, Olivier PT, Guingamp NC, Gonord PD, Netter PA, Blum AG, Guillot GM, Gillet PM, Loeuille DH. T2 mapping of rat patellar cartilage. *Radiology.* 2001 May;219(2): S.395-402. (2001)
- Welsch U: Sobotta – Lehrbuch Histologie, 2.Auflage. München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 2005: S.117-129 (2005)
- Xia Y, Farquhar T, Burton-Wurster N, Ray E, Jelinski LW. Diffusion and relaxation mapping of cartilage-bone plugs and excised disks using microscopic magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med.* 1994 Mar;31(3): S.273-382. (1994)
- Xia Y, Farquhar T, Burton-Wurster N, Lust G. Origin of cartilage laminae in MRI. *J Magn Reson Imaging.* 1997 Sep-Oct;7(5): S.887-894. (1997)
- Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, Abramson S, Altman RD, Arden N, Bierma-Zeinstra S, Brandt KD, Croft P, Doherty M, Dougados M, Hochberg M, Hunter DJ, Kwoh K, Lohmander LS, Tugwell P. OARSI recommendations for the management of

hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008 Feb;16(2): S.137-162. (2008)

10. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen:

Abbildung 1:	Zusammensetzung der Knorpelmatrix.....	- 9 -
Abbildung 2:	Zonale Gliederung des hyalinen Gelenkknorpels. Rasterelektronenmikroskop (übernommen aus Raya et al. MAGMA 2011 24(4):247-258.)	- 12 -
Abbildung 3:	Verteilung des Proteoglykangehalts (übernommen von Maroudas A et al. Annals of the Rheumatic Diseases, 1977, 36, S.399-406)	- 14 -
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der Zusammensetzung der ungeformten Knorpelmatrix	- 16 -
Abbildung 5:	Safranin-O-Färbung; Patella 22	- 18 -
Abbildung 6:	Stejskal-Tanner-Sequenz.....	- 24 -
Abbildung 7:	Darstellung einer Matrix	- 27 -
Abbildung 8:	Patella-Nr. 24, männlich, 25 Jahre. Nach Entnahme der Bohrproben	- 33 -
Abbildung 9:	Schlitten zum Einbringen der Patella in die Small Extremity Coil	- 35 -
Abbildung 10:	Patella 22, laterale Facette, Safranin-O-Färbung, Vergrößerung: 16x6,25	- 42 -
Abbildung 11:	Patella 22, laterale Facette, Safranin-O-Färbung, Vergrößerung: 16x6,25 + Unterteilung in 9 Felder	- 43 -

ABBILDUNGS- & TABELLENVERZEICHNIS

Abbildung 12:	Patella 17, Bohrzylinder aus der medialen Facette, Übersichtsaufnahme bei 20x Vergrößerung.....	- 47 -
Abbildung 13:	ADC-Map, Patella 15, slice 12	- 54 -
Abbildung 14:	Staffelung der ADC nach dem Alter	- 55 -
Abbildung 15:	Mittelwerte der ADC im gesamten Knorpel, Layer 1 und Layer 2. Jeweils für Gruppe A und Gruppe B.....	- 57 -
Abbildung 16:	ADC in Gruppe A und Gruppe B, nach Facetten unterteilt.....	- 59 -
Abbildung 17:	FA-Map Patella 15, slice 12	- 61 -
Abbildung 18:	FA aller Patellae, nach dem Alter aufsteigend sortiert.....	- 63 -
Abbildung 19:	FA in Gruppe A und B; gesamt, Layer 1 und Layer 2.....	- 65 -
Abbildung 20:	FA in Gruppe A und B; gesamt, Layer 1 und Layer 2.....	- 65 -
Abbildung 21:	Patella 44, laterale Facette, Safranin-O-Färbung, Vergrößerung: 16x6,25; Gruppe A.....	- 68 -
Abbildung 22:	Patella 51, mediale Facette, Safranin-O-Färbung, Vergrößerung: 16x6,25, Gruppe B. Es zeigen sich bereits an der Knorpeloberfläche geringere Anfärbungen mit Safranin-O, als in Gruppe A.....	- 68 -
Abbildung 23:	GWA - gesamte Knorpeldicke, Layer 1, Layer 2	- 69 -
Abbildung 24:	GWA - alle Patellae nach Alter aufsteigend sortiert	- 70 -
Abbildung 25:	GWA - alle Patellae; Übersicht über die einzelnen Felder.....	- 71 -
Abbildung 26:	GWA - Mittelwerte der einzelnen Felder.....	- 72 -
Abbildung 27:	GWA - Gruppe A und Gruppe B; Verlauf der GWA in den einzelnen Feldern.....	- 73 -

ABBILDUNGS- & TABELLENVERZEICHNIS

Abbildung 28:	Schematische Übersicht über zonalen Aufbau der einzelnen Patellae	- 76 -
Abbildung 29:	REM - Prozentuale Dicken der einzelnen Zonen . männliche und weibliche Patellae aufgetrennt	- 77 -
Abbildung 30:	REM - Prozentuale Dicken der einzelnen Zonen . Gruppe A und Gruppe B einzeln aufgetrennt	- 78 -
Abbildung 31:	REM - Prozentuale Dicke der Radiärzone nach Alter sortiert. inklusive Linear Fit.....	- 78 -
Abbildung 32:	Patella 21, Bohrzylinder aus der lateralen Facette, ca. 6000x vergrößert. Tangentialzone	- 79 -
Abbildung 33:	Patella 21, Bohrzylinder aus der lateralen Facette, ca. 6000x vergrößert. Transitionalzone	- 79 -
Abbildung 34:	Patella 21, Bohrzylinder aus der lateralen Facette, ca. 6000x vergrößert. Radiärzone	- 80 -
Abbildung 35:	Patella 21, Bohrzylinder aus der lateralen Facette, ca. 2400x vergrößert. Tide Mark.....	- 80 -
Abbildung 36:	Wassergehalt aller Patellae, nach Alter aufsteigend sortiert. Inklusive Regressionsgerade	- 81 -
Abbildung 37:	Korrelation GWA-ADC der Mittelwerte über den gesamten Knorpel. Mit Regressionsgeraden und Bestimmtheitsmaß R^2	- 84 -
Abbildung 38:	Korrelation GWA-ADC nach Layers aufgeteilt. Mit Regressionsgeraden und Bestimmtheitsmaß R^2	- 85 -

Tabellen:

Tabelle 1:	Übersicht über alle verwendeten Patellae und durchgeführten Messungen.....	- 36 -
Tabelle 2:	Parameter und Einstellungen der MR-Messungen.....	- 37 -
Tabelle 3:	Übersicht über alle Patellae der Gruppe A	- 49 -
Tabelle 4:	Übersicht über alle Patellae der Gruppe B	- 50 -
Tabelle 5:	Bedeutung des Korrelationskoeffizienten r	- 52 -
Tabelle 6:	Übersicht über die ADC-Ergebnisse aller Patellae, nach Alter aufsteigend sortiert.....	- 56 -
Tabelle 7:	Übersicht über die ADC im gesamten Knorpel, Layer 1 und Layer 2. Mittelwert, Standardabweichung, 95%-Konfidenzintervall und p-Wert werden angegeben.....	- 57 -
Tabelle 8:	ADC in Gruppe A und Gruppe B. Mittelwerte, Standardabweichungen, 95%-Konfidenzintervall und p-Wert	- 58 -
Tabelle 9:	ADC in männlichen und weiblichen Patellae; Mittelwert, Standardabweichung, 95%-Konfidenzintervall und p-Wert	- 60 -
Tabelle 10:	ADC - Sektorenanalyse der männlichen und weiblichen Patellae	- 60 -
Tabelle 11:	Übersicht über die FA-Werte aller Patellae	- 62 -
Tabelle 12:	FA - gesamte Patellae, Layer 1 und Layer 2; jeweils Mittelwert, Standardabweichung, 95%-Konfidenzintervall und p-Wert	- 64 -
Tabelle 13:	FA - Sektorenanalyse der männlichen und weiblichen Patellae	- 66 -
Tabelle 14:	GWA - Gruppe A und Gruppe B; nach Layers aufgeteilt	- 73 -

ABBILDUNGS- & TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 15:	GWA - männlich und weiblich; einzelne Felder, Layers und p-Werte.....	- 74 -
Tabelle 16:	Prozentuale Dicken der einzelnen Zonen; Mittelungen aus allen Patellae.....	- 76 -
Tabelle 17:	REM - Prozentuale Dicke der Radiärzone - männliche und weibliche Patellae	- 77 -
Tabelle 18:	Prozentualer Wassergehalt in Gruppe A und Gruppe B.....	- 82 -
Tabelle 19:	Übersicht über alle im Scatterplot verwendeten Patellae	- 83 -

11. Abkürzungsverzeichnis

ADC	Apparent Diffusion Coefficient
AGE	Advanced Glycation Endproducts
BMI	Body Mass Index
CaCl ₂	Calcium-Chlorid
DTI	Diffusion-Tensor-Imaging
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FA	Fractional Anisotropy / Fraktionelle Anisotropie
FLASH	Fast Low Angle SHot
FoV	Field of View
GAG	Glykosaminoglykan
GWA	Grauwert-Analyse
HF-Puls	Hochfrequenzimpuls
KI	Konfidenzintervall
KKG	Knorpel-Knochen-Grenze
MD	Mittlere Diffusivität
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natrium-Chlorid
PaCaSe	Patellar Cartilage Segmentation
REM	Rasterelektronenmikroskopie
PFA	Paraformaldehyd
ROI	Region of interest
SNR	Signal-to-noise ratio (Signal-Rausch-Verhältnis)
STABW	Standardabweichung
T	Tesla
T2	T2-gewichtete MRT-Sequenz; zeichnet sich durch lange TR und lange TE aus
TE	Time to echo (Echozeit)
TENS	Transkutane elektrische Nervenstimulation
TI	Inversion time (Inversionszeit)
TR	Time to repeat (Wiederholungszeit)

12. Appendix

Auswertungsroutine der gefärbten Schnitte mit dem Programm KS.400:

1. Einlesen eines Safranin-O-gefärbten Schnitts:
„imgload“
2. Umwandlung in Graustufen:
„imgRGB2grey 1,2“
3. Segmentierung und Ausschneiden der Chondrozyten:
„scalint 2,3,0,255,0,255”
„delin 3,4,1,9”
„disdyn 4,5,50,0,1”
„Gclear 0”
„binnot 5,6”
„binand 2,6,7“
4. Einzeichnen einer rechteckigen ROI, die die gesamten Knorpeldicke umfasst:
“Grectg a,b,c,d,10,0”
5. Unterteilung in 9 Sub-ROIs und Berechnung der Mittelwerte der Graustufen. Dabei werden schwarze, nicht gefärbte Bereiche nicht in die Berechnung mit einbezogen:
„for i=0,i<=8,i=i+1
u=b+i*d/9
summe=0

zaehler=0
durchschnitt=0

k=0
l=0
Grectg a,u,c,d/9,10,0

```
for k=u,k<=u+d/9,k=k+1
  for l=a,l<=a+c,l=l+1
    readpixel 7,l,k,1,1,pixel

        if (pixel != 0)
            summe=summe+pixel
            zaehler=zaehler+1
        endif
    endfor
endfor

durchschnitt=summe/zaehler

if (i == 0)
    ds0=durchschnitt
    write ds0
endif
if (i == 1)
    ds1=durchschnitt
    write ds1
endif
if (i == 2)
    ds2=durchschnitt
    write ds2
endif
if (i == 3)
    ds3=durchschnitt
    write ds3
endif
if (i == 4)
    ds4=durchschnitt
```

```
        write ds4
    endif
    if (i == 5)
        ds5=durchschnitt
        write ds5
    endif
    if (i == 6)
        ds6=durchschnitt
        write ds6
    endif
    if (i == 7)
        ds7=durchschnitt
        write ds7
    endif
    if (i == 8)
        ds8=durchschnitt
        write ds8
    endif
endfor“
```

13. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Maximilian Reiser möchte ich in hohem Maße für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung aller Gerätschaften danken.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Reinhard Putz, der mir Zugang zu den Laboratorien der Anatomischen Anstalt der LMU München und dem Rasterelektronenmikroskop gewährte, und somit den anatomischen Anteil der Arbeit ermöglichte.

Mein besonderer Dank gilt den Betreuern PD Dr. med. Christian Glaser, der mich während der ganzen Zeit bei der Erstellung der Arbeit unterstützt hat.

Frau Dr. rer. biol. hum. Lucianna Filidoro möchte ich danken, dass sie mir in den Anfängen der Arbeit bei phsikalischen und technischen Fragestellungen zur Seite stand.

Mein Dank gilt zudem auch Frau Silvia Adam-Neumair und Herrn Thielke, die mich in großem Maße bei der Safranin'O-Färbung und der Rasterelektronenmikroskopie unterstützten.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Dr. Alexander Crispin für die statistische Beratung.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. rer. biol. hum. José Raya, der mit zahlreichen hilfreichen Ratschlägen und stets freundschaftlichen und aufmunternden Worten in jeglicher Hinsicht maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

Zu guter Letzt möchte ich noch meinen Eltern, meinen Mitbewohnern und Freunden danken, die während dem Erstellen dieser Arbeit an so manchen Tagen auf meine Anwesenheit verzichten mussten.

Euch allen ein herzliches

Vergelt's Gott.

Eidesstattliche Versicherung

Kellerer, Andreas

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Diffusion-Tensor-Imaging des Retropatellaren Gelenkknorpels im Vergleich mit der Anatomie

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Schweitenkirchen, 01.08.2014

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand