

Klinik für Orthopädie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ. Prof. Dr.med. Rüdiger Krauspe

**„MALDI-TOF Imaging
Ein geeignetes Verfahren in der Meniskusdiagnostik?“**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Jenny Petzold
2017

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Dekan: Univ. Prof. Dr.med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr.med. Axel Baltzer

Zweitgutachter: Prof. Dr.med. F. Boege

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

J. Petzold, Rita Casadonte, M. Otto, M. Kriegsmann, M. Granrath, A. Baltzer, J. Vogel, P. Drees, S. Deininger, M. Becker, J. Kriegsmann (2014), *MALDI-Massenspektrometrie am Meniskus-Objektivierung morphologischer Befunde*, Z Rheumatol 2014, 1-9.

Zusammenfassung

Hintergrund

Im Hinblick auf die Komplexität der verschiedenen Veränderungen des Meniskugewebes scheint es wichtig zu sein ein objektives Untersuchungsverfahren zu etablieren. Der Kliniker erwartet vom Facharzt für Pathologie, klare Aussagen hinsichtlich des Schweregrades vorbestehender oder sekundär entstandener Veränderungen sowie zu Art und Alter traumatisch bedingter Einrisse.

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob die MALDI-TOF Imaging Massenspektrometrie ein geeignetes und objektives Analyseverfahren für Meniskugewebe darstellt.

Material und Methoden

Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete Meniskusgewebeproben von 68 Patienten wurden mittels MALDI-TOF Imaging analysiert.

Ergebnisse

Meniskusklassifikationen zur Unterscheidung von Low-grade vs. High-grade bzw. zwischen akuter und nicht-akuter Meniskusdegeneration konnten durch differenziell exprimierte Masse/Ladungsverhältnisse durch statistischen Vergleich mittels T-Test und einem zuvor definierten durchschnittlich zweifach erhöhten Intensitätsunterschied determiniert werden.

Schlussfolgerung

Massenspektrometrische Methoden tragen zur Objektivierung der histopathologischen Diagnostik der Meniskusläsionen bei. In die Befundung einbezogen werden sollten histologische, histochemische und proteomischen Daten. Aussagen zur Degeneration oder Fragen, ob eine akute oder ältere Reißbildung vorliegt, können getroffen werden. Eine präzise gutachterliche Äußerung ist nur möglich, wenn sämtlich klinische und morphologische Daten vorliegen und korreliert werden.

Abkürzungsverzeichnis

A	Arteria	mmHg	Millimeter Hydrargyrum
Aa	Arterien	MMP	Matrix-Metalloprotease
Abb	Abbildung	MRT	Magnetresonanztomographie
arb.u	arbitrary unit	N	Nervus
Aqua dest	Aqua destillata	NaCl	Natrium-Chlorid
AVG	average	OARSI	Osteoarthritis Research Society International
bzw	beziehungsweise	PAS	periodic acid Schiff reaction
BG	Berufsgenossenschaft	PWKW	p-Wert kombiniert aus Wilcoxon und Kruskal-Wallis Test
Da	Dalton	SLRP	small leucine-rich proteoglycans
et al	et alia	SVM	Support Vector Machine
HE	Hämatoxylin-Eosin	Tab.	Tabelle
ICRS	International Cartilage Repair Society	vs.	versus
Lig.	Ligament	z.B.	zum Beispiel
MALDI-TOF ...	Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight		
MALDI/IMS	MALDI Imaging mass spectrometry		

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Anatomie des Kniegelenkes	3
1.1.1	Makroskopische Anatomie des Kniegelenkes.....	3
1.1.2	Entwicklung und anatomischer Aufbau der Menisken.....	3
1.2	Funktion und Biomechanik der Menisken.....	9
1.3	Meniskusverletzungen	11
1.3.1	Diagnostik von Meniskusverletzungen	11
1.4	Meniskusdegeneration.....	14
1.5	Die histopathologische Beurteilung von Meniskusgewebe.....	15
1.6	Die Geschichte der Massenspektrometrie und Anwendung von MALDI-TOF.....	17
1.7	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	19
2	Material und Methoden.....	20
2.1	Probanden	20
2.2	Gewinnung der Proben durch die Kniegelenksarthroskopie.....	20
2.3	Färbungen	21
2.3.1	Deparaffinierung.....	22
2.3.2	Hämatoxylin-Eosinfärbung	22
2.3.3	Alcianblaufärbung.....	23
2.3.4	Berliner-Blau Reaktion nach Perls	23
2.4	Begutachtung der Proben.....	23
2.5	MALDI-TOF Verfahren-Anwender Protokoll	24
2.5.1	Vorbereitung und Aufteilung der formalinfixierten Gewebeproben.....	24
2.5.2	Deparaffinierung.....	24
2.5.3	Antigendemaskierung.....	25
2.5.4	Proteolyse	25
2.5.5	Kalibrierung	25
2.5.6	Messung.....	25
2.5.7	Versuchsablauf.....	27
2.6	Statistik	28
2.7	Verbrauchsmaterial.....	28
2.7.1	Verbrauchsmaterial Hämatoxylin-Eosinfärbung	28
2.7.2	Verbrauchsmaterial Berliner-Blau Reaktion	28
2.7.3	Verbrauchsmaterial Alcianblau-Färbung	29
2.7.4	Verbrauchsmaterial MALDI-TOF-Analyse	29
2.7.5	Sonstiges Verbrauchsmaterial	30
3	Ergebnisse	31
3.1	Klassifikation zwischen High-grade und Low-grade Meniskusdegeneration	31
3.2	Klassifikation zwischen akuter (frischer Rissbildung) und nicht-akuter Meniskusdegeneration	34
3.3	Datenabgleich mit SwissProt Database.....	38

4	Diskussion	41
4.1	Beurteilung der Methoden	41
4.1.1	Gewinnung der Proben durch Kniegelenksarthroskopie	41
4.1.2	Die Verwendung von Klassifikationsmodellen	42
4.1.3	Die Anwendung des MALDI-TOF Imaging Verfahrens in der histopathologischen Diagnostik	43
4.1.4	Die Verwendung von Support Vector Machines	46
4.2	Diskussion der Ergebnisse	48
4.2.1	Chronische Meniskopathie und traumatische Meniskusläsion	49
5	Zusammenfassung	54
6	Literatur- und Quellenverzeichnis	55
7	Anhang	66

1 Einleitung

Im klinischen Alltag ist der Facharzt für Orthopädie häufig mit Patienten, welche an Arthrose leiden, konfrontiert. Laut statistischem Bundesamt ist dies die weltweit häufigste Erkrankung des erwachsenen Menschen. Das Kniegelenk ist neben dem Hand- und Hüftgelenk am häufigsten betroffen (1).

Meniskusschädigungen treten häufig in Kombination mit Arthrose auf (2).

In Deutschland werden jährlich 413.000 Kniegelenksarthroskopien durchgeführt. Neben degenerativen und traumatischen Meniskusläsionen zählen Knorpelschädigungen oder Verletzungen des vorderen und hinteren Kreuzbandes zur Indikation der Arthroskopie (3).

Eine erhöhte Lebenserwartung sowie die Zunahme an Sportverletzungen sind als Gründe für die Zunahme von Kniegelenks- und Meniskuserkrankungen zu sehen (4).

Eine Untersuchung von 10117 Kniegelenksarthroskopien bei Patienten mit Meniskuspathologien (5) im Jahr 2008 ergab, dass akute Meniskusverletzungen vor allem Männer im Alter von 31-40 Jahren betreffen. Bei Frauen hingegen finden sich Meniskusverletzungen über alle Altersgruppen verteilt. Bei etwa 30% der nahtfähigen (peripheren) Meniskusverletzungen tritt eine Zweitverletzung auf, meist eine vordere Kreuzbandruptur (5).

Es existiert eine Vielzahl an Untersuchungen und Veröffentlichungen, die sich mit dem Thema der Meniskuspathologien auseinandersetzen. Hinsichtlich der histologischen Beurteilung des entnommenen Meniskusgewebes liegen unterschiedliche Konzepte vor (6, 7, 8). Neben verschiedenen Färbemethoden, wie z.B. Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Alcianblau-Färbung, Elastica van Gieson, stehen wenige immunhistochemische Methoden zur Verfügung (6). Diese unterstützen die Beurteilung des Pathologen, jedoch ist die Untersuchung hierbei vor allem abhängig von der jeweiligen Erfahrung und subjektiven Beurteilung des Facharztes für Pathologie und durch eine Vielzahl von Bewertungsrichtlinien erschwert (8, 9, 10).

Longo et al setzte sich 2013 in einem Review über die verschiedenen Bewertungsrichtlinien für tissue-engineered, ex vivo und degenerativ verändertem Meniskusgewebe kritisch auseinander (8). Laut Longo et al werden die Veränderungen im Meniskusgewebe unter verschiedenen Gesichtspunkten betrachtet. So berücksichtigt der modifizierte Mankin Score die Knorpelstruktur, die Zellabnormitäten und den Proteoglycan-

gehalt (8). Die modifizierte „Copenhaver Classification“ teilt die Degeneration von Kollagenbündeln in Graden von 0-4 ein (8). Eine weitere Beurteilungsskala wurde 2011 von Pauli (7) vorgestellt. Diese bewertet die Gewebsveränderungen des Meniskus unter den folgenden Gesichtspunkten: Gewebsmorphologie, Zellularität, Matrix und Kollagenfaserorganisation, hyaline und mukoide Degeneration, Kalzifizierung, Zysten, Risse, Safran-O-Färbeintensität, Zellgruppierungen und Kalziumeinlagerungen (7, 8).

Diese hier aufgeführten Scoring-Systeme stellen nur einen Auszug aus einer Vielzahl existierender histologischer Bewertungssysteme dar. Die Diversität der Scores dokumentiert die Unsicherheit in der bestehenden Diagnostik.

Es erscheint daher wichtig eine standardisierte histopathologische Untersuchungsmethode von Meniskusgewebe zu etablieren, die eine einfache, unabhängige und reproduzierbare Methode darstellt. Anhand dieser Untersuchungsmethode können genaue Ergebnisse zur Verbesserung von Therapiekonzepten führen und somit Folgeschäden vermindert werden.

In der vorliegenden Arbeit wird eine Untersuchungsmethode am Meniskusgewebe mittels MALDI-TOF-Imaging (Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight) die zur Analyse von Gewebe, Organen und komplexen biologischen Strukturen verwendet, wird vorgestellt (12, 13, 14, 15).

Hierbei wird Gewebe mit einer Matrix überschichtet, um eine „Flugfähigkeit“ von Ionen nach Laserapplikation auf biologische Strukturen zu erzielen, um damit Masse/Ladungsverhältnisse von zahlreichen Peptiden nachzuweisen und morphologischen Strukturen zuzuordnen (12, 13, 14, 15).

Die „bildgebende Massenspektrometrie“ bietet damit neue Möglichkeiten, z.B. für die Zelltypisierung und Erforschung von Wirkungsweise und Anreicherung von Arzneistoffen im Gewebe (16). Stoffwechselprozesse oder degenerative Vorgänge können besser verstanden werden.

Die Möglichkeit einer objektiven Einordnung des Degenerationsgrades durch die Beantwortung der Frage nach einer akuten oder chronischen Rissbildung, soll in der vorliegenden Arbeit untersucht und kritisch diskutiert werden.

1.1 Anatomie des Kniegelenkes

1.1.1 Makroskopische Anatomie des Kniegelenkes

Das Kniegelenk ist das größte Gelenk im menschlichen Körper. Es ist ein Drehscharniergelenk, bestehend aus den Kondylen des Femurknochens, die auf den flachkonvexen Oberflächen der Tibia ruhen. Auf der Gelenkfläche der Tibia befinden sich die Menisken. Vorn ist die Patella am Kniegelenk beteiligt. Umschlossen wird das Kniegelenk durch eine Gelenkkapsel. Gelenkstabilität erhält das Articulatio genu durch einen kräftigen Bandapparat, bestehend aus den Außenbändern Lig. collaterale tibiale (mediales Seitenband) und dem Lig. collaterale fibulare (laterales Seitenband) sowie der knieumfassenden Muskulatur. Des Weiteren komplettieren das vordere (Lig. cruciatum anterius) und hintere Kreuzband (Lig. cruciatum posterius) das Kniegelenk. In der Gesamtheit zeigt das Kniegelenk hiermit sowohl statische als auch dynamische Stabilität (17).

Die geometrischen Formen der Komponenten, die an der Bildung des Kniegelenkes beteiligt sind, lassen folgenden Bewegungen zu (18):

- Beugung bis 150°
- Streckung bis 180° (entspricht 0° in der Neutral-Null-Methode)
- Innenrotation bei rechtwinklig gebeugtem Knie bis 10°
- Außenrotation bei rechtwinklig gebeugtem Knie bis 30°

1.1.2 Entwicklung und anatomischer Aufbau der Menisken

In den anfänglichen Studien, die bis in das 18. Jahrhundert zurückreichen, wurde den Menisken keine relevante Funktion zugeordnet (17, 19). Diverse Studien zeigen jedoch, dass die Menisken eine große Rolle bezüglich der Kniestabilität, Funktion und Dynamik spielen. Wesentliche Funktionen der Menisken sind Kraftübertragung und Stoßabsorption bei Bewegungen (20, 21, 22). Der laterale Meniskus z.B. überträgt 50-60% der Kraft auf das Kniegelenk (23). Für die Funktionalität der Menisken sorgt der komplexe Aufbau, der hier im weiteren Kapitel erläutert werden soll.

Die humanen Menisken entstammen dem mesenchymalen Gewebe. Ihre Entwicklung ist bereits in der 8. Embryonalwoche abgeschlossen und sie sind in dieser Periode bereits halbmondförmig angelegt (19, 24). Das Zellgerüst besteht in der Embryonalperiode hauptsächlich aus Fibrozyten, die extrazelluläre Matrix fehlt fast vollständig. In der fortgeschrittenen Entwicklung des Fetus bilden sich bereits erste Kollagenbündel,

die wie beim adulten Meniskus, zirkumferent ausgerichtet sind (19). Postnatal erfolgt eine stetige Zunahme der Kollagenfasern und der extrazellulären Matrix (19).

Gleichzeitig erfolgt im Laufe der Entwicklung eine Abnahme der blutversorgenden Gefäße. In der Fetalperiode sind die Menisken noch reich an Blutgefäßen bis zur Adoleszenz nehmen diese jedoch ab (26).

Die meniskalen Strukturen des menschlichen Kniegelenkes vergrößern durch ihren Aufbau die Oberfläche des Tibiaplateaus, um die Femurkondylen besser aufnehmen zu können.

Im Querschnitt sind die Menisken keilförmig aufgebaut, die hohe Kante liegt peripher, kapselnah, die niedrige Kante zentral. Die proximale Oberfläche der Menisken ist konkav und steht mit den Femurkondylen in Kontakt, die distale Oberfläche dagegen ist flach und ruht auf dem Tibiakopf (26).

In einer Veröffentlichung von McDermott et al (27) findet sich eine mittlere Ausdehnung des Außenmeniskus in a.p.-Richtung von 35,7 mm und des Innenmeniskus von 45,7 mm. Der Umfang des lateralen Meniskus beträgt im Mittel 91,7 mm, der des medialen Meniskus 99,0 mm. Die Höhe des lateralen Meniskus wurde im Mittel mit 6,75 mm und des medialen Meniskus mit 6,5 mm ermittelt (27, 28).

Der mediale Meniskus ist C-förmig aufgebaut und mit dem Innenband des Kniegelenks verwachsen. Im Durchschnitt hat er eine anterior-posteriore Länge von ca. 3,5 cm. Das Vorderhorn des Meniskus ist im Bereich der anterioren Fossa intercondylaris im Bereich des vorderen Kreuzbandes mit dem Tibiaplateau verbunden (26, 27).

Die posterioren Fasern des Vorderhorns sind mit dem Lig. transversum verbunden, welches zwischen medialen und lateralen Meniskus eine Koppelung darstellt. Das Hinterhorn des medialen Meniskus ist mit der Tibia im Bereich der posterioren Fossa intercondylaris, zwischen dem hinteren Kreuzband und dem lateralen Meniskus, fest verbunden. Der periphere Anteil des medialen Meniskus ist in seiner gesamten Länge mit der Gelenkkapsel verwachsen (22, 29).

Der Außenmeniskus ist nahezu rund. Mit seiner Struktur bedeckt er die tibiale Oberfläche fast vollständig. Das Vorderhorn des lateralen Meniskus ist mit der Tibia vor der Eminentia intercondylaris und hinter dem Ansatz des vorderen Kreuzbandes verbunden, das Hinterhorn des lateralen Meniskus ist hinter der Eminentia intercondylaris, vor dem hinteren Kreuzband verbunden. Eine Befestigung mit dem Außenband existiert

hier nicht (29,30). Zusätzlich besteht eine Anheftung des posterioren Horns des lateralen Meniskus am Femur durch das menisiofemorale Ligament, ein akzessorisches Band, welches vom Hinterhorn des lateralen Meniskus zur medialen Kondyle, im Bereich des Ansatzes des hinteren Kreuzbandes zieht. Hier wird zwischen posteriorem menisiofemoralem Band (Lig. Wrisberg) und anteriorem (Lig. Humphrey) unterschieden (26, 31, 32).

Die Gliederung erfolgt jeweils in ein ventrales Meniskusvorderhorn und ein dorsales Meniskushinterhorn, dazwischen liegt die sogenannte Pars intermedia. Befestigt sind die Menisken mit ihrer Basis an der Tibia über Fasern der Gelenkkapsel und untereinander durch das Lig. genu transversum, welches jedoch nicht immer existiert (20, 31). Diese nicht starre Fixierung ermöglicht den Menisken eine Anpassung an Bewegung des Kniegelenks. Beuge und Rotationsbewegungen des Kniegelenks werden so ermöglicht (33). Die anatomischen Strukturen sind in Abbildung 1 dargestellt.

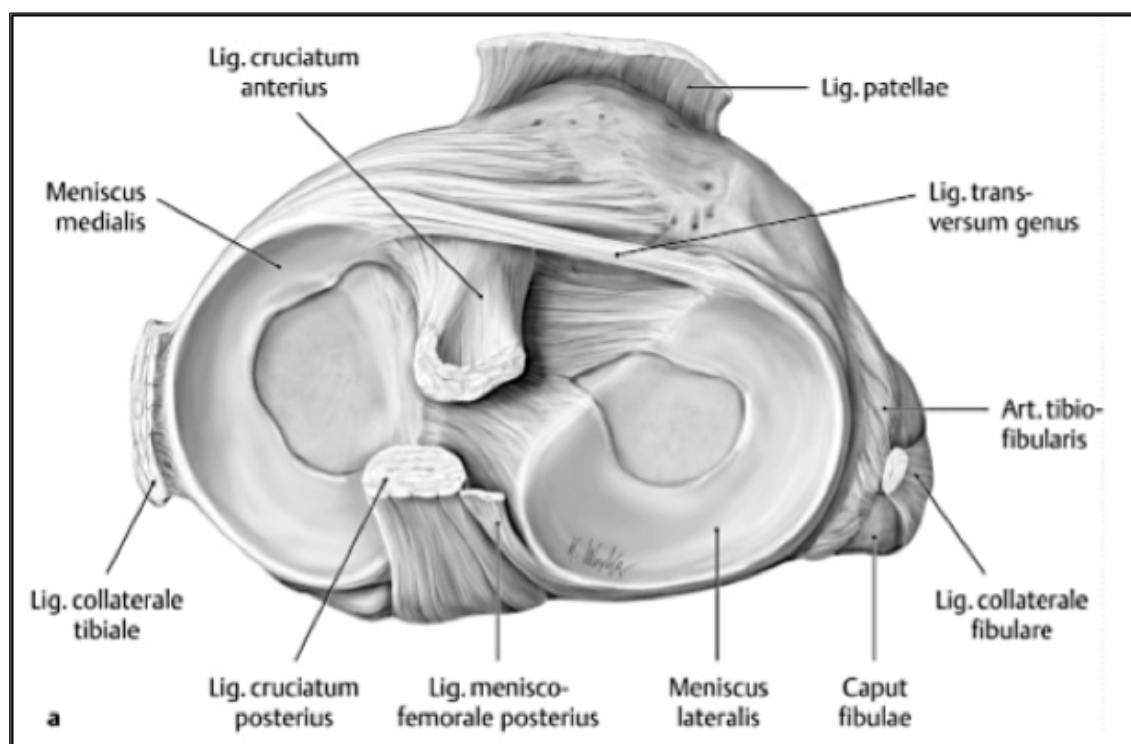


Abb. 1: Kniegelenksaufsicht (38, die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung)

Eine Sonderform der Menisken stellen sogenannte Scheibenmenisken oder diskoide Menisken dar (28, 34). Definitionsgemäß sind dies abnormal große und dicke Menisken, die den Gelenkspalt ausfüllen bzw. das Tibiaplateau fast vollständig bedecken (34).

In der Literatur wurde das Vorkommen eines lateralen Scheibenmeniskus vor über 100 Jahren beschrieben. Insgesamt ist das Auftreten von Scheibenmenisken selten und ohne Krankheitswert und stellt keine Ursache von Kniegelenksbeschwerden dar (28, 34, 35).

Das menschliche Meniskusgewebe besteht vorwiegend aus 72% Wasser, 22% Kollagen, 0,8% Glykosaminoglykane und 0,12% DNA. Im posterioren Teil des Meniskus ist der Wasseranteil wesentlich höher als im zentralen oder vorderen Anteil (35).

Der Meniskuskörper besteht zu ca. 80% aus Typ I Kollagenfasern. Zusätzlich kann Kollagen Typ II, III, V und VI gefunden werden. Prominent erscheint in den oberflächlichen Schichten Kollagen Typ II, eine gleichmäßige Verteilung der verschiedenen Kollagentypen findet man nicht (28, 36).

Die Typ I Kollagene des Meniskus unterscheiden sich von den Kollagenen in Knochen, Sehnen oder der Haut durch einen höheren Hydroxylysin und Hydroxylysin-Glycosid Gehalt. Des Weiteren sind meniskale Kollagenfasern stark mit Hydroxylysin basierenden Aldehyden verknüpft (36).

In seiner Veröffentlichung beschreibt C. Stärke (28) den elektronenmikroskopischen Aufbau der Kollagenstruktur im Meniskus als dreischichtig. Oberflächlich findet sich ein fibrilläres Fasernetzwerk, ohne Faserorientierung. Darunter, so C. Stärke, schließt sich eine lamelläre Schicht an und kollagene Fibrillen bilden laminäre Bündel. Den Hauptteil machen hierbei kollagene Fasern mit zirkumferenter Ausrichtung aus (28, 36, 37).

Auch Bullough et al konnten nachweisen, dass die Kollagenfasern hauptsächlich zirkumferent angeordnet sind und somit für die Ringspannung sorgen (33). Dies erlaubt den Menisken sich bei axialen und bei Torsionsbewegungen auszudehnen. Zusätzlich verlaufen entlang der longitudinalen Fasern radiär verlaufende Kollagenfasern, welche zusätzlich für strukturelle Rigidität sorgen (36). Die Abbildung 2 zeigt eine schematische Darstellung der Kollagenfaseranordnung im Meniskus.

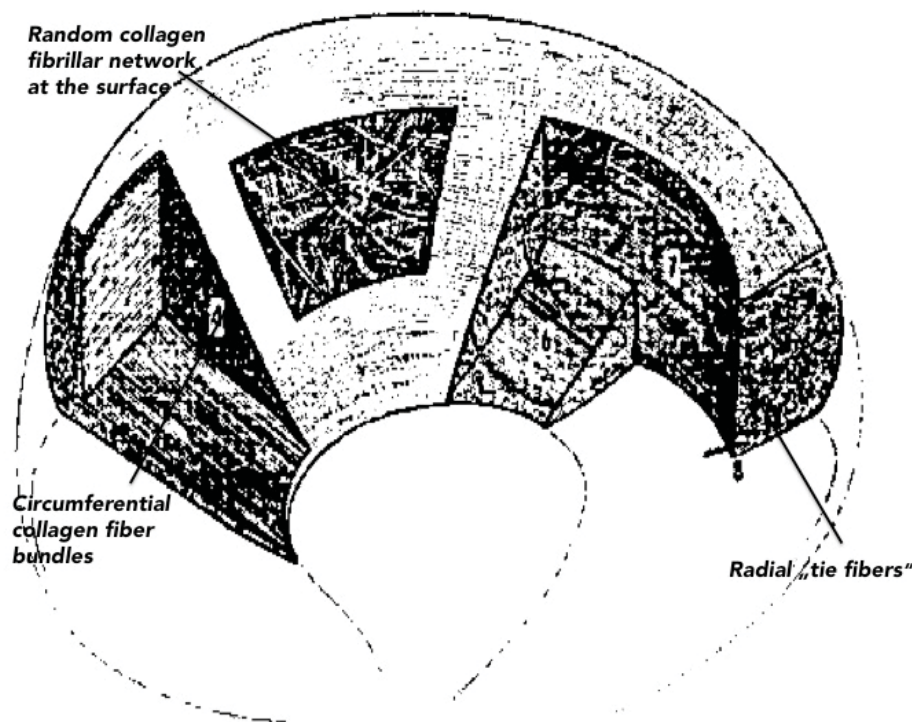


Abb. 2: Darstellung der Kollagenfaserverteilung im Meniskus (33, die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung)

Je nach Bereich des Meniskugewebes können unterschiedliche Zelltypen nachgewiesen werden. Im inneren Drittel findet man vorwiegend Chondrozyten und Fibrochondrozyten. Im mittleren Bereich zeigen sich Fibrozyten und im äußeren Drittel Fibroblasten. Eines der Hauptproteoglykane in der Extrazellulärmatrix ist Aggrecan (6). Proteoglykanen werden eine übergeordnete Rolle hinsichtlich der Hydratation, Elastizität und Stabilität zugeordnet (6, 37).

Die Blutversorgung des Kniegelenks erfolgt im kapselnahen Bereich über die Äste der A. poplitea (Aa. articulares inferiores, mediales und laterales). Die zentralen Anteile sind gefäßfrei und werden ausschließlich über die Synovialflüssigkeit ernährt (20, 38). Hinsichtlich der Blutversorgung erfolgt eine Einteilung in die Red-Red-Zone, Red-White-Zone und White-White-Zone.

Arnoczky und Warren (37) konnten nachweisen, dass nur peripheres Meniskusgewebe in der sogenannten „Red-Red Zone“ liegt und hier eine Blutversorgung erfolgt. Im Mittleren Drittel oder der sog. „Red-White Zone“ ist die Blutversorgung sehr limitiert. In der sogenannten „White-White Zone“ findet keine aktive Blutversorgung statt. Hier erfolgt die Versorgung mittels Diffusion und Zirkulation der Synovialflüssigkeit (20, 37).

Die Darstellung der meniskalen Blutversorgung erfolgt in Abbildung 3 schematisch.

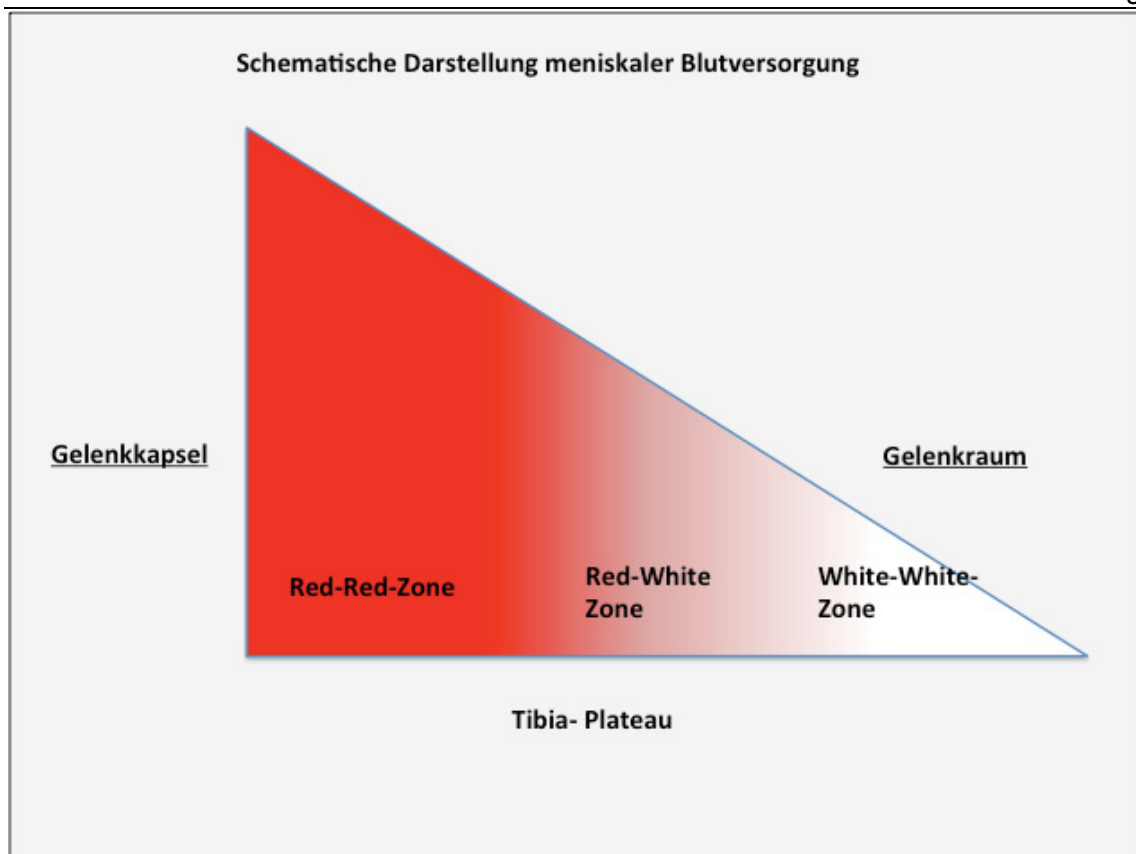


Abb. 3: Schematische Darstellung der meniskalen Blutversorgung

Die nervale Versorgung des Kniegelenks geht aus dem Plexus lumbalis hervor und erfolgt dann über Äste des N. tibialis posterior, N. obturatorius und N. femoralis. Nervenfasern penetrieren die Gelenkkapsel und ziehen in Begleitung der Gefäße auch zu den Menisken (18, 20).

M. A. R. Freeman und andere Autoren konnten das Vorhandensein von verschiedenen Rezeptoren im Kniegelenk und in den peripheren Meniskusanteilen nachweisen (20, 39, 40).

In Vorder- und Hinterhörnern, aber auch im Bereich der Gelenkkapsel, findet man ein gehäuftes Vorkommen der Mechanorezeptoren (41).

Das Vorkommen folgender Rezeptoren wird in der Literatur beschrieben (39, 41):

Typ I Rezeptoren: sie entsprechen den Ruffini-Körperchen. Dies sind Mechanorezeptoren mit Vorkommen vor allem in den oberflächlichen Schichten des anterioren und posterioren Anteils der Kniegelenkscapsel. Ruffini-Mechanorezeptoren sind afferente und langsam adaptierende Rezeptoren, die auf Änderungen der Gelenkposition und Druck reagieren.

Typ II Rezeptoren: sie entsprechen den Paciniszellen, die zu den Mechanorezeptoren zählen. Sie adaptieren sich schnell auf Änderungen von Spannungen und Beschleunigungen. In den tieferen Schichten der Kapsel werden die Typ II Rezeptoren von einem Blutgefäß begleitet.

Typ III Rezeptoren: sie entsprechen nach heutigen Kenntnissen den Golgi-Rezeptoren, welche hauptsächlich in Bändern und Sehnen gefunden werden. Sie reagieren bei Änderungen des Bewegungsausmaßes und sind verknüpft mit neuromuskulärer Inhibition.

Als **Typ IV Rezeptoren** werden drei Arten von unmyelinisierten Nervenendigungen beschrieben, die unter anderem eine Funktion als Schmerzrezeptoren vorweisen.

Schmerzen bei einer Meniskusverletzung wurden der Kapseldehnung, dem Meniskusriss oder einer sekundären Synovitis zugeschrieben (42).

Neuere Forschungen haben ergeben, dass Neurotransmitter, deren Vorkommen in den Nozizeptoren beschrieben werden, die sogenannten Tachykinine, eine Rolle bei der Schmerzentstehung spielen. T. Mine konnte in seiner immunhistochemischen Studie von 1998 nachweisen, dass ein Teil der Schmerzen von den Menisken selbst ausgeht. Er konnte des Weiteren nachweisen, dass sich die Nervenfasern und sensorischen Rezeptoren vornehmlich in der vaskulären (Red-Red-)Zone befinden und von einem Blutgefäß begleitet werden. Unterschiedliche Schmerzentstehungsmechanismen in der avaskulären und vaskularisierten Zone werden unterschieden (42).

Entsteht ein Riss peripher, so läuft der Schmerzreiz über den verschlissenen Meniskus, die Nozizeptoren der Kapsel und der Synovia.

Erfolgt die Verletzung in der innervierten Zone, erfolgt die Schmerzleitung direkt über Nervenfasern im Meniskus (42).

1.2 Funktion und Biomechanik der Menisken

Die Menisken und ihre Anordnung auf dem Knochen repräsentieren eine funktionelle Einheit. Die Inkongruenz der Femurkondylen und des Tibiaplateaus werden durch die Menisken ausgeglichen (30). Hierdurch wird die Kontaktfläche der femorotibialen Anteile vergrößert, gleichzeitig wird die auf den Gelenkknorpel wirkende Belastung reduziert und verteilt. Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass 50% bis 70% der auf die jeweiligen Kompartimente wirkenden Belastung von den Menisken aufgenommen wird (30, 43). Für die Lastverteilungsfunktion besonders bedeutend sind die festen Veranke-

rungen der Meniskusvorder- und hinterhörner (44). Ein Abweichen der Menisken nach außen wird verhindert, des Weiteren wird dadurch ein Teil der axialen Druckbelastung in Zirkularspannung umgewandelt (22, 36).

Neben Vergrößerung der Kontaktfläche zwischen Femur und Tibia (28, 45). erfüllen die Menisken vielfältige Aufgaben: sie sind Stoßdämpfer, sind beteiligt an der Knorpelnutrition und Lubrication, erleichtern das Gelenkgleiten, verhindern Hyperextension und schützen den Gelenkraum (20). Ferner verteilen sie die Kraft und reduzieren den Stress auf der Tibia, eine essentielle Funktion um den Knorpel zu schützen und somit Arthrose vorzubeugen (22).

Bei Beugung des Kniegelenks bewegen sich die Menisken, dem Auflagepunkt des Femurs folgend, nach hinten und krümmen sich mehr, um sich dadurch dem veränderten Radius der Femurkondylen anzupassen. Bei Streckbewegungen gelangen die Menisken wieder nach vorn. Auch bei Rotationsbewegungen bei gebeugtem Knie bewegen sich die Menisken und verändern Ihre Form (40). Bei der Außenrotation des Unterschenkels wird der laterale Meniskus nach der Tibia nach vorn geschoben, der mediale Meniskus zurückgezogen, bei der Innenrotation verläuft dies umgekehrt.

Zusätzlich erfüllen die Menisken die sekundäre Stabilisierung des Kniegelenks bei ligamentärer Instabilität. Sowohl Mow et al (36) und C. Stärke (28) sehen die Grundlage für diese Funktion in der speziellen Kollagenfaserarchitektur.

Wie bereits vorab beschrieben, besteht der Hauptteil der Kollagenfasern aus zirkumferent angeordneten Bündeln, die von der anterioren zur dorsalen tibialen Insertion verlaufen (28). Eine Umkehrung von Druckkräften in Zugspannungen wird durch den keilförmigen Querschnitt des Meniskus bewirkt. Die Zugspannungen können dann durch die anatomischen Gegebenheiten zum Meniskusvorder- oder hinterhorn weitergeleitet werden (28).

Aus den Kenntnissen der Meniskusbiomechanik ergeben sich wichtige Überlegungen für die Knorpelschädigung und Beginn der Arthrose. So folgerten Mow et al (36) und Kohn et al (31), dass es infolge einer Durchtrennung von Vorder-oder Hinterhörnern der Menisken, oder einer radiären Rissbildung bis an die Meniskusbasis hinreichend, zu einem vollständigen Verlust der Lastverteilungsfunktion der Menisken kommt. Eine Entstehung der Arthrose wird somit gefördert (30, 31, 36). Dies gilt auch für eine partielle Meniskektomie, die die anatomische Form der Menisken beeinträchtigt.

Im Zuge einer partiellen Meniskotomie mit intakter Meniskusperipherie bleibt die Funktion, d.h. die Lastverteilung, im Wesentlichen erhalten (43).

1.3 Meniskusverletzungen

„Meniskusverletzungen bilden die häufigste Ursache für operative Eingriffe am Kniegelenk“ (20). Bei einer Meniskusläsion berichten die Patienten von typischen Symptomen wie z.B. Schmerz, Blockierung oder Schwellung des Kniegelenks mit Erguss (46, 47). In epidemiologischen Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass Meniskusverletzungen beim Fußball und Skifahren am häufigsten auftreten (49). Meniskuspathologien sind bei Personen männlichen Geschlechts 2,5 mal häufiger als bei Personen weiblichen Geschlechts (50). Es besteht ein höheres Risiko für traumatische Meniskusläsionen bei Männern in der Altersgruppe von 31-40 Jahren, bei Frauen hingegen liegt der Altersgipfel im Bereich von 11 bis 20 Jahren (50).

Unterschieden werden zum einen degenerative Läsionen, diese betreffen hauptsächlich ältere Menschen, zum anderen traumatische Meniskusläsionen, die vor allem bei jüngeren Menschen im Rahmen von Sportverletzungen vorkommen. Aufgrund der erhöhten Elastizität des kindlichen Meniskus, treten Meniskusverletzungen hier kaum auf (50).

Traumatische Verletzungen des Meniskusgewebes entstehen durch äußere Krafteinwirkungen auf das Knie. Bei Schädigungen des lateralen Meniskus erfolgt dies häufig in Kombination mit einer vorderen Kreuzbandruptur (20, 50). Der Verletzungsmechanismus ist meist eine Außenrotations- und Flexionsbewegung unter Valgusstress, bei entlastetem Kniegelenk (20, 47). Mediale Meniskusläsionen entstehen meist unter Belastung des Kniegelenks (47). Auch bei Komplexverletzungen des Kniegelenks, wie z.B. Tibiakopffrakturen, konnte gezeigt werden, dass sie oft direkt mit einer Meniskusläsion vergesellschaftet sind (52, 51).

Im Rahmen von altersbedingter Degeneration des Meniskusgewebes kann es sogar ohne adäquates Trauma zum Auftreten von Meniskusläsionen kommen.

Dies kann Folge von erhöhtem oder frühzeitigem Meniskusverschleiß und wiederholter Mikrotraumata sein (48).

1.3.1 Diagnostik von Meniskusverletzungen

Sowohl die klinische Untersuchung als auch die Magnetresonanztomographie gehören zu den nichtinvasiven Untersuchungen des Kniegelenks bei Knieschmerzen.

Für die klinische Untersuchung der Meniskusschädigung existieren verschiedene Tests. Diese richten sich nach der lokalen Beschwerdesymptomatik im Meniskusbereich. Die Verlässlichkeit ist oft unzureichend und richtet sich in hohem Maße nach der Erfahrung des Untersuchers, der Sorgfalt und Erwartungshaltung (52).

Untergliedert werden die Tests in Kompressionstests und Bewegungstest. Zu den klassischen Kompressionstests zählen der Ab- und Adduktionstest nach Böhler und das Payr'sche Zeichen. Zu den Bewegungstests zählen neben Steinmann I und Steinmann II, das Apley-Zeichen und der McMurray-Test (52).

Bei der apparativen Diagnostik zählt das MRT heute zum Goldstandard. Mit einem besonders hohen negativen Vorhersagewert ist dies eine gute Methode, um meniskale Verletzungen und Verletzungen des vorderen Kreuzbandes zu detektieren (53). Etwa 90% der Meniskusverletzungen können mittels MRT korrekt diagnostiziert werden (48).

In Abbildung 4 werden MRT-Befunde und der dazugehörige intraoperative Befund von zwei Probanden männlichen und weiblichen Geschlechts dargestellt.

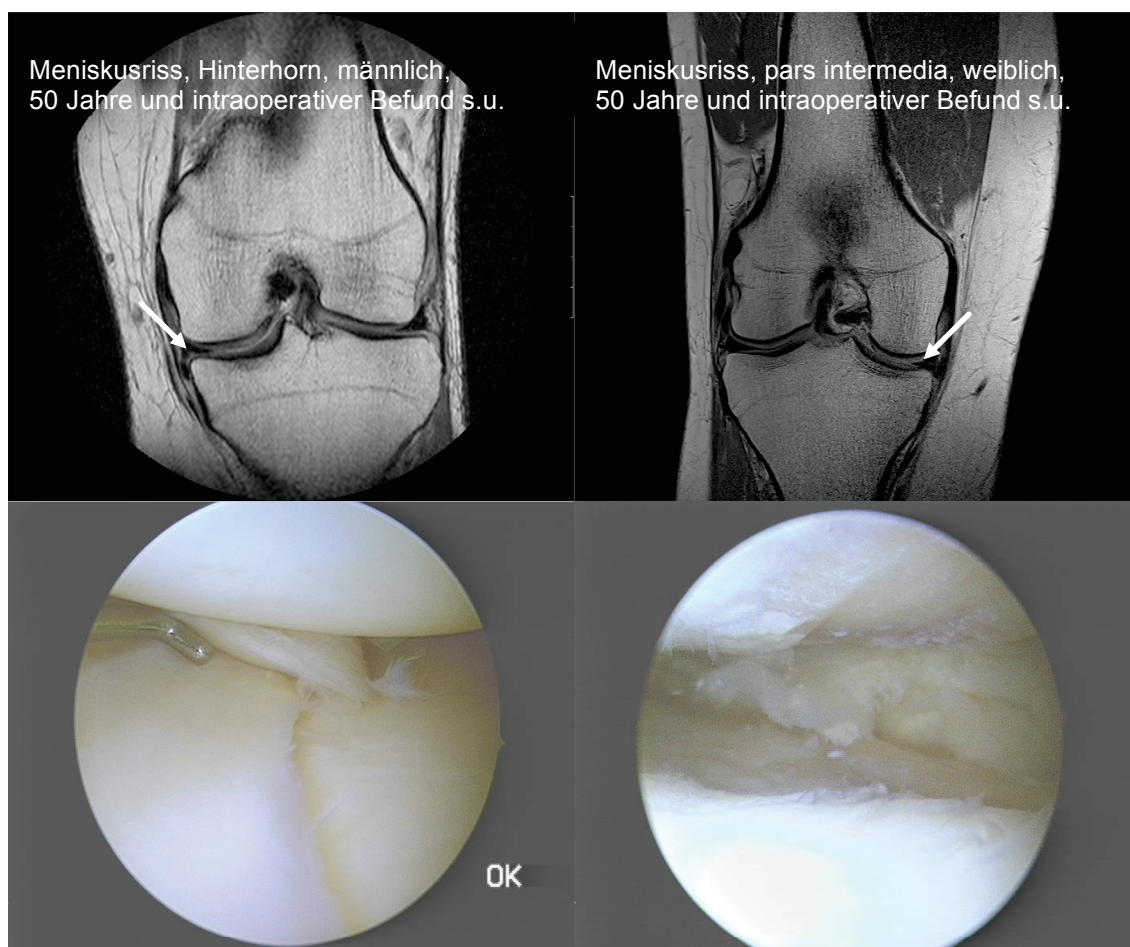


Abb. 4: Die Abbildung zeigt in der Gemeinschafts-Praxis für Orthopädie, Zentrum für Molekulare Orthopädie, Düsseldorf (mit freundlicher Genehmigung) erhobenen MRT-Bilder sowie den dazugehörigen arthroskopisch, intraoperativen Befund von zwei Patienten männlich und weiblichen Geschlechts im Alter von 50 Jahren

Die Einteilung der Meniskusverletzungen erfolgt anhand der Rissarten. Diese werden in **vertikale (longitudinale und radiäre), schräge und komplexe Risse** (54) klassifiziert.

Die mit 81% am häufigsten vorkommenden Meniskusrisse sind schräge und vertikal-longitudinale Risse (55). Im höheren Alter werden meist degenerative Meniskusläsionen im posterioren Anteil des Meniskus gefunden (55).

Vertikal-longitudinale Läsionen verlaufen parallel entlang der „Meniskulängsachse“, zwischen den zirkumferent verlaufenden Kollagenfasern und senkrecht zum Tibiaplateau (55, 56). Diese Art von Meniskusläsion kann sich komplett oder inkomplett darstellen (54).

Komplette Risse werden auch als sogenannter „Bucket handle tears“ oder Korbhenkelrisse beschrieben. Bei dieser Form der Verletzung ist häufig der mediale Meniskus betroffen. Ausgehend ist diese Läsion meist vom posterioren Anteil. Schädigungen können bis zu 2/3 des gesamten Meniskus tangieren. Häufig sind diese Rissarten instabil und verursachen Knieblockierungen, wie z.B. Streckhemmung (47, 54).

Inkomplette Risse hingegen verursachen nicht immer Beschwerden (54).

Vertikal-radiäre Läsionen verlaufen senkrecht zur Längsachse des Meniskus und des Tibiaplateaus. Häufig werden diese Risse zwischen Hinterhorn und mittlerem Drittel des medialen Meniskus oder im Bereich der hinteren Ansatzstelle des lateralen Meniskus gefunden. Tritt diese Meniskusläsion auf, so beeinflusst diese Schädigung die Übertragung der Belastungskräfte und führt somit zu einer vermehrten Belastung des Gelenkknorpels. Eine RepARATION dieser Risse ist nicht möglich (54).

Horizontalläsionen verlaufen parallel zum Tibiaplateau und teilen die Meniskussubstanz in einen oberen und unteren Teil. Durch den Rissverlauf wird die Kollagenbündelstruktur durchbrochen. Häufig werden horizontale Meniskusläsionen im höheren Alter und in Kombination mit Meniskuszysten beobachtet (54).

Schräge Läsionen hingegen können an jeder beliebigen Stelle auftreten. Am häufigsten werden diese im posterioren und mittleren Drittel des Meniskus gefunden (54).

Die Abbildung 5 visualisiert in schematischer Darstellung die unterschiedlichen Rissformen der Kniegelenksmenisken (57).

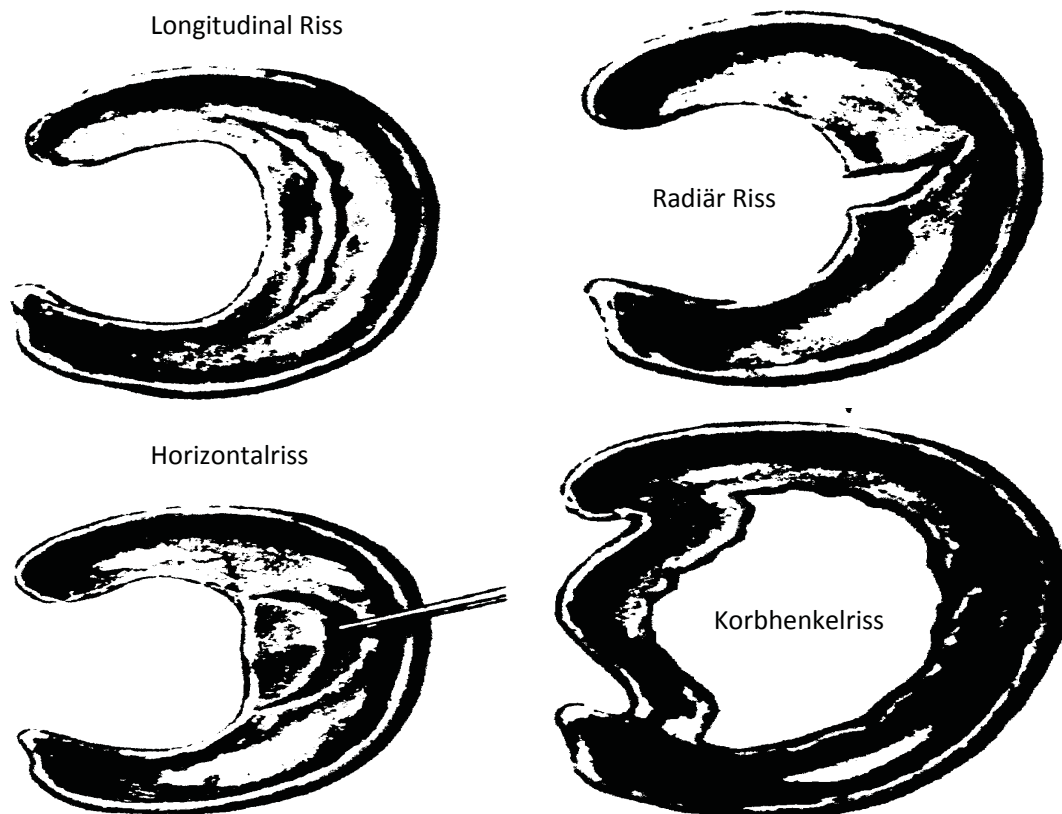


Abb. 5: Schematische Darstellung der Meniskusrisse (57, die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung)

1.4 Meniskusdegeneration

Definitionsgemäß wird unter der Meniskusdegeneration „... die Summe morphologisch fassbarer Texturstörungen an zellulären und fibrillären Meniskusbestandteilen nach ischämisch-nutritiven Stoffwechselstörungen“ verstanden (10). Erste Beschreibungen über histopathologische Veränderung des Meniskusgewebes stammen aus den 1930er Jahren. Trotz über 80 Jahren histopathologischer Forschung auf diesem Gebiet, gibt es nur wenige und teils konkurrierende Konzepte hinsichtlich der Ätiopathogenese (58).

Die Meniskusdegeneration wird zum Teil als Folge endogener Defekte oder exogener Verletzungen angesehen (6). Des Weiteren wird vermutet, dass die Synthese von Mucopolysacchariden nach schlechter Ernährung des Meniskusgewebes relevant ist (58). In anderen Forschungsarbeiten wird das posttraumatische Hämatom und die damit verbundene Änderung der mechanischen Belastung für die Verursachung von degenerativen Verletzungen verantwortlich gemacht (59). Durch verschiedene wissenschaftliche Arbeiten wurde verifiziert, dass die Meniskusdegeneration alters- und belastungsabhängig ist (58).

Histomorphologisch werden 3 verschiedene Varianten der Meniskusdegeneration beschrieben (58):

- kalzinöse Degeneration
- azelluläre hyaline Degeneration
- mukoide Degeneration

Die häufigste Form ist die mukoide Degeneration und ist abhängig von der Stelle der degenerativen Verletzung. Hier erfolgt die Unterteilung in intrameniskale stromale und zystisch parameniskale Mukoiddegeneration (58).

Sowohl Veränderungen auf zellulärer Ebene als auch Veränderungen der extrazellulären Matrix sind maßgebliche Kriterien zur Beurteilung des Degenerationsgrades. Ebenso wird die Färbereaktion der Grundsubstanz zur Beurteilung herangezogen (58).

Zur Einstufung des Degenerationsgrades wurden in den letzten Jahrzehnten verschiedene Klassifizierungs- und Beurteilungsskalen entwickelt. Zu den gebräuchlichsten zählen sicherlich Mankin, OARSI, ICRS-Scoring System, und Pauli Score, um nur einige zu nennen (8). Je nach Scoring-System werden verschiedene Aspekte der Meniskusstruktur betrachtet, wie z.B. Zell- und Matrixstruktur, Zelltypus oder Art der Meniskusverletzung (7, 8).

Dem allgemeinen Trend in der Pathologie folgt dagegen Krenn mit seinem Vorschlag, eine Untergliederung der Meniskusdegeneration in Low-grade und High-grade Degeneration, unter Berücksichtigung von Zellveränderungen und Matrixabbauvorgänge, einzuteilen (58).

1.5 Die histopathologische Beurteilung von Meniskusgewebe

Die Menisken erfüllen vielfältige Aufgaben in der Biomechanik des Kniegelenks (60). Es werden daher möglichst sparsame Resektionen (durch Arthroskopie) oder gar die operative Refixierung im Falle einer entsprechenden Meniskusläsion angestrebt (60). Für den Orthopäden oder auch bei gutachterlichen Fragestellungen, z.B. im Rahmen von Arbeitsunfällen, ist eine aussagekräftige histopathologische Untersuchung des Meniskusgewebes von Bedeutung.

Für die histopathologische Untersuchung stehen dem Pathologen oft nur Gewebsfragmente von einer Größe von 5-20 mm zur Verfügung (60).

Unterschieden werden muss über das Vorliegen von degenerativen oder traumatischen Veränderungen. Neben der mikroskopischen Betrachtung sind klinischen Angaben über Entnahmestelle und Anamnese für den Pathologen essentiell (60).

Üblicherweise erfolgt die Beurteilung des entnommenen Materials unter dem Lichtmikroskop, unter zu Hilfenahme von histochemischen Färbemethoden, wie Hämatoxylin-Eosin, Berliner-Blau oder Alcianblau-Färbetechniken. Wichtig hierbei ist es, physiologische mögliche zelluläre und fibrilläre histologische Veränderungen von den unphysiologischen, dem altersüblichen Maß überschreitenden Veränderungen, abzugrenzen (10).

Der Pathologe differenziert zum einem zwischen primärer Degeneration, d.h. das altersübliche Maß an Texturveränderungen ohne klinisch bekannte traumatische Schädigung, und zum anderen sekundärer Degeneration. Dies sind Texturveränderungen im Meniskusgewebe als Folge einer Noxe, z.B. Arthrose (6, 10, 60). Das histologische Erscheinungsbild zeigt hier vor allem eine Reduktion der Zellzahl und eine inhomogene Verteilung der Chondrozyten. Im Bereich der Matrix kommt es zu einer ungleichmäßigen Verteilung der Färbung (PAS, HE). Mukoide Degeneration und Fibrillierungen, sogenannte Amianthoidfasern, sind zu finden. Es kommt außerdem zu spaltenförmigen Defekten, Pseudozysten, Dissektionen und Kontinuitätstrennungen (7, 10).

Bisher erfolgte die Einteilung des degenerativen Defekts, wie vorab beschrieben, anhand verschiedener Degenerationsscores.

Neben altersüblichen Veränderungen des Meniskusgewebes müssen auch die traumatisch bedingten Läsionen berücksichtigt werden. Eine bedeutsame Grundlage der Begutachtung "... ist die Abgrenzung vorbestehender, das altersübliche Maß überschreitender, degenerativer Veränderungen, im Sinne einer vorbestehenden Meniskopathie, gegenüber eindeutigen Meniskusverletzungen" (10).

Durch das Auftreten von Nekrosen, Proliferationen, Fibrinauflagerungen, Meniskozyten und Narben kann zwischen einem frischen, älteren und alten Riss unterschieden werden. Die Unterscheidung von einer traumatisch bedingten Läsion ist nach den Kriterien Fisseler-Eckhoff und Müller (61) möglich:

Frischer Riss (Phase 1, Tage)	Auffaserungen, Nekrose, Fibrinauflagerungen
Älterer Riss (Phase 2, Wochen)	Meniskozyten, Fibroblasten, Proliferation
Alter Riss (Phase 3, Monate)	Rissglättung, Narbe

Tabelle 1: Regenerationsphasen nach Meniskusriss (61)

1.6 Die Geschichte der Massenspektrometrie und Anwendung von MALDI-TOF

Ihren Ursprung hat die Massenspektrometrie mit Sir J. J. Thomson vom Cavendish Laboratorium der Cambridge Universität. Seine Studien an elektrischen Gasentladungen führten 1897 zur Entdeckung des Elektrons. Anfang des 20. Jahrhunderts konstruierte der Wissenschaftler den ersten Massenspektrographen für die Ermittlung von Masse/Ladungsverhältnisse von Ionen und erhielt hierfür 1906 den Nobelpreis für Physik. Kommerziell wurde die Massenspektrometrie seit den 1940er Jahren genutzt, anfänglich vor allem in der Petroleumindustrie angewandt, um Isotopenhäufigkeiten von kleinen Hydrocarbonen in Arbeitsabläufen zu messen. Später verwendeten die chemischen und physikalischen Sparten der Industrie die Methode zur Überwachung von Verfahrensprozessen, z.B. für die Messung von Konzentrationen eines Stoffes in den hergestellten Produkten (62, 63).

Das MALDI-TOF-Verfahren (Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight) ist eine Kombination aus den Verfahren Matrix unterstützter Laser-Desorption/Ionisation und Massenspektrometrie mit Flugzeitanalysator zur Massenanalyse von Makromolekülen (62). Dies ist eines von zwei sogenannten sanften Ionisierungstechniken welche den Nachweis von großen nicht geladenen und labilen Molekülen mittels Massenspektrometrie erlauben.

Verschiedene Arbeitsgruppen entwickelten die Methode der Massenspektrometrie weiter bis letztendlich das MALDI-TOF-Verfahren 1988 (62, 63, 64, 65) vorgestellt wurde. Die ersten Geräte wurden im Jahre 1991 in den Markt eingeführt (66). In den letzten Jahren wurde die Massenspektrometrie zu einem unverzichtbaren Mittel zur Durchführung von Studien an Proteinen (67, 68, 69). Desorptions- und Ionisationstechniken haben die Möglichkeit der Analyse von Proteinen erweitert (67). In den letzten Jahren nutzten die Forscher die verschiedenen Vorteile der MALDI-TOF Anwendungen und machten diese Technik sensitiver, robuster und wertvoll (11). MALDI-TOF/IMS ist ein

Verfahren, welches die direkte Analyse von Molekülen (Proteine, Peptide, Lipide und Metaboliten) in Gewebsfragmenten erlaubt (13, 15). Die Technik untersucht intaktes Gewebe, Konservierungs- oder Separierungsschritte werden vermieden. Die 2-D Darstellung mittels Gelelektrophorese ist nicht mehr notwendig (69).

Ein Nachteil der Analyse von Proteinen mittels Gel-Elektrophorese ist, dass der Zusammenhang zwischen Zellen und Gewebe zerstört wird (11). Ein Hauptvorteil der MALDI-TOF/IMS Methode gegenüber herkömmlichen Methoden sind die fehlenden Reinigungs- oder Separierungsschritte (11). Neuartig ist auch eine räumliche Bestimmung der Moleküle im Gewebe mit MALDI-TOF Imaging (12, 13, 15, 70). Die Anwendung des Verfahrens erfolgt aber auch, um bestimmte Wirkungsweisen von Medikamenten, deren Metaboliten oder die Mechanismen von Erkrankungen (Rheumatoide Arthritis, Rheumatoide Synovitis) zu verstehen (11, 12, 13).

Noch bis vor einigen Jahren konnte MALDI-TOF nur an Gefrierschnitten angewendet werden. Eine in der Sammlung, Prozessierung und Lagerung sehr aufwendige Methode. Die Kühlkette darf hier auf keinen Fall unterbrochen werden, da eine einsetzende Proteolyse und Temperaturschwankungen das Ergebnis beeinflussen können (15).

Seit einiger Zeit kann die MALDI-TOF Analyse auch an Paraffinschnitten erfolgen. Der Grund hierfür ist die Anwendung und die Entwicklung von Antigen-Demaskierungstechniken (15).

Nach J. Kriegsmann ist dies von besonderer Bedeutung, da Gewebeschnitte in den meisten Pathologien in Paraffin gegossen archiviert werden und somit für weitere Untersuchungen zur Verfügung stehen können (15).

1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Im Hinblick auf die Komplexität der verschiedenen Veränderungen des Meniskusgewebes scheint es wichtig zu sein ein objektives Untersuchungsverfahren zu etablieren. Der Kliniker erwartet vom Facharzt für Pathologie klare Aussagen hinsichtlich des Schweregrades vorbestehender oder sekundär entstandener Veränderungen, sowie zu Art und Alter traumatische bedingter Einrisse. Besonders bei der Klärung von versicherungsmedizinischen Aspekten benötigt der gutachterlich tätige Arzt verlässliche Aussagen bezüglich der vorliegenden Schädigung. Neben anamnestischen Angaben unterliegt die histopathologische Beurteilung von Meniskusgewebe der Erfahrung des Facharztes für Pathologie. Wie bereits im vorliegenden Kapitel erörtert gibt es keine einheitliche Richtlinie und verschiedene Beurteilungskriterien der Meniskuspathologie.

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob die MALDI-TOF IMS ein geeignetes und objektives Analyseverfahren für Meniskusgewebe darstellt. Dabei gilt es folgende Hypothesen zu überprüfen:

Hypothese I:

Die MALDI-TOF/IMS ist ein geeignetes Verfahren zur histopathologischen Diagnostik von Meniskusgewebe.

Hypothese II:

Eine untersucherunabhängige Objektivierung der histopathologischen Meniskusdiagnostik kann durch die MALDI-TOF/IMS erreicht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Probanden

Die 68 Probanden der Studie waren sowohl weiblichen als auch männlichen Geschlechts, im Alter von 21-85 Jahren. Das mittlere Alter betrug 55,54 Jahre, der Altersmedian liegt bei 55. Zu den Studienteilnehmern zählten 32 weibliche Probanden mit einem Altersdurchschnitt von 61,2 Jahren und 36 männliche Probanden mit einem Altersdurchschnitt von 49,7 Jahren.

Die Studie wurde vorab von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Studiennummer 3775 genehmigt.

Alle Probanden wiesen klinische Symptome einer Meniskusschädigung auf.

Nach eindeutiger Sicherung der Diagnose erfolgte nach schriftlicher Einwilligung die Indikation zur arthroskopischen Meniskusteilresektion.

2.2 Gewinnung der Proben durch die Kniegelenksarthroskopie

Das Patientenkollektiv stellte sich mit bestehenden Knieschmerzen in der Orthopädischen Gemeinschaftspraxis, Zentrum für Molekulare Orthopädie, in Düsseldorf vor, hier erfolgte die Untersuchung des Kniegelenks.

In Zusammenhang mit den Beschwerden der Patienten und den erhobenen körperlichen Untersuchungsbefunden erfolgte die Indikation zur Kniegelenksarthroskopie und Meniskusteilresektion.

Nach präoperativer Vorbereitung (Laboruntersuchung und schriftliche Einwilligung) konnte der Eingriff in Allgemeinanästhesie durchgeführt werden.

Zunächst erfolgt die Lagerung des Patienten in Rückenlage auf dem OP-Tisch mit Beinschale (Fa. Maquet). Eine Blutsperrmanschette wird angelegt. Nach sterilem Abwaschen und Abdecken erfolgt die Anlage der Blutsperrmanschette mit einem Verschlussdruck von 350 mmHg.

Primär erfolgt die Etablierung eines lateralen Zugangs. Hierzu wird in Höhe der Patellaspitze, eine Fingerbreite nach lateral, mittels Stichinzision der Zugang angelegt. Ein Trokar wird in das Kniegelenk eingeführt. Nun wird das Arthroskop, bestehend aus

einer dünnen Optik, Kamera und Kaltlichtquelle, eingebracht. Gleichzeitig erfolgt über diesen Zugang im Trokar das Infiltrieren von Flüssigkeit (NaCl-Lösung).

Jetzt wird die Kniegelenkshöhle inspiziert, Knorpel- oder Meniskusschäden werden photodokumentiert. Anschließend erfolgt das Anlegen des medialen Zuganges. Hierfür wird unter Sicht mit einer Kanüle der optimale Zugangsweg für die vorliegende Schädigung ausgewählt. Nach Etablierung des medialen Zuganges können Arbeitsinstrumente, wie z.B. Shaver, Punch oder Faszangen eingeführt werden.

Im Falle der medialen Meniskusschädigung wird eine Punchzange verwendet. Im Bereich der Schädigung wird das erkrankte Gewebe schrittweise mit der Punchzange abgetragen. Eine Gewebeprobe im Bereich der direkten Schädigung wird entnommen und in zwei Hälften geteilt. Hiervon wird ein Gewebestück in Formalinlösung asserviert, die andere Hälfte nativ in Kryoröhrchen gegeben und nach Beendigung des Eingriffs in flüssigem Stickstoff gelagert.

Nach Beendigung der arthroskopisch-chirurgischen Therapie werden alle Instrumente aus dem Kniegelenk entfernt. Die Hautinzisionen mit Prolene® (Fa. Ethicon) verschlossen.

Die entnommen, formalinfixierten Proben werden zur weiteren Diagnostik in das Molekularpathologische Institut nach Trier versendet. Im MVZ Trier erfolgen die weiteren Untersuchungen.

Die in Stickstoff asservierten Proben werden auf Trockeneis ebenfalls ins Molekularpathologische Institut nach Trier versendet.

2.3 Färbungen

Im Rahmen der Studie werden für mehrere in Paraffin gebettete Gewebsschnitte (3-5 µm) Hämatoxylin- und Eosinfärbung, Alcianblaufärbung und Berliner-Blau-Reaktion angefertigt. In der Tabelle 2 werden die Färbeeigenschaften dargestellt. Die Färbetechnik wird anhand der jeweiligen Protokolle in Kap. 2.4 deutlich. Die histochemische Färbung von Gewebe setzt die Deparaffinierung der Gewebeproben voraus, dies wird ebenfalls im Kap 2.4 erläutert.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung	Zellkerne, basophiles Zytoplasma, Kalk und Bakterien werden blau eingefärbt, azidophiles Zytoplasma, Bindegewebe und Fibrin werden Rot angefärbt
Alcianblau-Färbung	Anfärbung von sauren Mucopolysacchariden
Berliner-Blau-Reaktion	Dient dem Nachweis von Eisen (Fe 3+) und weist damit Hämosiderin nach, Zytoplasma und Zellkerne werden rot angefärbt, Fe 3+ wird blau angefärbt

Tabelle 2: Darstellung der Färbeeigenschaften (71)

2.3.1 Deparaffinierung

Die Gewebeschnitte müssen vor der jeweiligen histochemischen Färbung vom Paraffin befreit werden. Hierfür wird das eingebettete und fixierte Gewebe 2 x 3 Minuten in Xylol-Lösung gewaschen. Die Proben werden dann in Ethanol 100% (vol/vol), 95% und 70% rehydriert und mit destilliertem Wasser gespült.

Anschließend kann der Gewebeschnitt entsprechend gefärbt werden.

2.3.2 Hämatoxylin-Eosinfärbung

Die Hämatoxylin-Eosinfärbung zählt zu den sogenannten Standardfärbungen in der histologischen Begutachtung. Sie wird in der täglichen histopathologischen Diagnostik angewandt.

Färbevorgang:

1. Paraffinschnitte entparaffinieren, aufsteigende Ethanolreihe
2. Spülen mit Aqua dest
3. Tauchen der Proben in saurem Hämalaun nach Mayer für 10 sec
4. Spülen mit Aqua dest
5. Tauchen der Proben in Eosin 10 sec
6. Tauchen der Proben in 60% Ethanol
7. Eosin-Lösung
8. Aufsteigende Alkoholreihe
9. Isopropanol

2.3.3 Alcianblaufärbung

Anfärbung von sauren Mucopolysacchariden

Färbevorgang:

1. Entparaffinieren, aufsteigende Alkoholreihe
2. Tauchen der Gewebeschnitte in 3% Essigsäure für 10 Minuten
3. Alcianblau 1% für 10 Minuten
4. Tauchen in Essigsäure 3%
5. Spülen mit Aqua dest
6. Kernechtrot in Aluminiumsulfat für 7 Minuten
7. Spülen mit Aqua dest
8. Aufsteigende Alkoholreihe, Xylol

2.3.4 Berliner-Blau Reaktion nach Perls

Nachweis von Fe 3+ Ionen werden mit Hexacyanoferrat II im sauren Milieu als Berlinerblau, einem blauen Farbkomplex, nachgewiesen.

Färbevorgang:

1. Paraffinschnitte entparaffinieren, absteigende Ethanolreihe
2. Spülen mit Aqua dest
3. Reaktionslösung aus 2% Hexacyanoferrat II und 1% HCL zu gleichen Teilen mischen, Proben tauchen
4. Spülen mit Aqua dest
5. Gegenfärbung mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat 10 Minuten
6. Spülen mit Aqua dest
7. Aufsteigende Ethanolreihe und Xylol

2.4 Begutachtung der Proben

Die Begutachtung der Proben erfolgt durch 2 erfahrene Fachärzte für Pathologie aus dem MVZ Pathologie in Trier (M. O. und J. K.).

Die Graduierung der Meniskusdegeneration erfolgt durch die von Krenn et al im Jahr 2010 vorgeschlagene Einteilung in High-grade und Low-grade Meniskusdegeneration (58, Tabelle 3).

Grad 0: normale Morphologie	Chondrozyten isomorph, regelhafte Zellularität, Matrix eosinophil, homogen angefärbt
Low-grade Degeneration	
Grad 1: leichte Degeneration	leichte Verringerung der Zellularität in kleinen Bereichen inhomogen gefärbte Matrix, kleinstteilige Fissuren der Matrix
Grad 2: mäßige Degeneration	Mäßige Verringerung der Zellularität in großen Bereichen, Chondrozyten in Form und Größe variabel, Mäßige umschriebene Fissuren der Matrix
High-grade Degeneration	
Grad 3: schwere Degeneration	Starke Verringerung der Zellularität, große zellfreie Areale, retikulär gefärbte Matrix (mukoide Degeneration), Pseudozystische Risse der Matrix

Tabelle 3: Von Krenn et al festgelegte Einteilung der Meniskusdegeneration (58)

2.5 MALDI-TOF Verfahren-Anwender Protokoll

Matrix assisted laser desorption/ionization (MALDI), time of flight (TOF) ist ein Verfahren der Massenanalyse von chemischen Verbindungen, vorzugsweise von Peptiden organischer Verbindungen, also eine Kombination von Matrix unterstützter Desorption/Ionisation, Massenspektrometrie und Flugzeitanalyse der Ionen. Die Vorbereitung und Durchführung des Analyseverfahrens erfolgt anhand eines festgelegten Protokolls (R. Casadonte).

2.5.1 Vorbereitung und Aufteilung der formalinfixierten Gewebeproben

Die Gewebeproben werden in Paraffin eingelegt und dann mit einem Mikrotom in 3-5 µm Dicke geschnitten und für die MALDI-Analyse auf einem ITO (Indium tin oxide) beschichteten Objektträger aufgetragen, getrocknet und können nun bis zur weiteren Verarbeitung bei Raumtemperatur gelagert werden.

2.5.2 Deparaffinierung

Die bereits gelagerten Proben müssen für die MALDI-TOF Analyse deparaffiniert werden. Hierfür wird das eingebettete und fixierte Gewebe für 2 x 3 Minuten in Xylol-Lösung gewaschen. Die Proben werden dann in Ethanol 100% (vol/vol), 95% und 70% rehydriert und mit destilliertem Wasser gespült.

2.5.3 Antigendemaskierung

Um die Proteolyse vorzubereiten werden die Proben mit Tris-HCL Pufferlösung (10mM) mit einem pH-Wert von 9.0 bei 95° im Autoklaven für 20 Minuten inkubiert. Für weitere 10-15 Minuten werden die Proben im Autoklaven mit der Pufferlösung belassen danach wird die Pufferlösung mit destilliertem Wasser ausgetauscht.

2.5.4 Proteolyse

Nach Entparaffinierung und Antigendemaskierung wird ein in-situ Trypsinverdau auf den Gewebeschnitten durchgeführt.

Nun wird die Trypsin-Lösung (0,5µg/µL) mit Hilfe eines ImagePrep-Gerätes (Bruker Daltonik GmbH) auf die Schnittpräparate auf ITO-beschichtete Glasobjektträger gesprüht. Anschließend erfolgt die Inkubation der Proben für 1,5 Stunden bei 37° C in einer feuchten Kammer.

CHCA-Matrix Lösung, bestehend aus 7mg/ml in 50/50 Azetonitril/0,5% TFA wird mit Hilfe des ImagePrep Gerätes auf die verdauten Schnitte entsprechend des Handbuchs aufgetragen.

2.5.5 Kalibrierung

Um genaue Messdaten erheben zu können, muss zuerst eine Kalibrierung des Gerätes vorgenommen werden. Hierfür wird eine Mixtur von Peptiden (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland) verwendet. Dazu gehören: Angiotensin II, Angiotensin I, Substanz P, Bombesin, Adrenocorticotrophes Hormon Clip 1-17, Adrenocorticotrophes Hormon Clip 18-39 und Somatostatin 28.

2.5.6 Messung

Der Objektträger mit den vorbehandelten Gewebeproben wird nun in die Messkammer des Massenspektrometers, Autoflex Speed TOF/TOF (Bruker Daltonik GmbH) platziert. Während des Messvorgangs bewegt sich der Laser automatisiert auf den zu untersuchenden Proben. Massenspektren werden in einem Bereich von m/z 600-4500 erstellt. Der räumliche Abstand der Laserimpulse (Mittelpunktabstand) beträgt 150µm. Aus dem Datensatz können nach Reduzierung von Störfaktoren, Massenspektren unterschiedlicher Regionen der Gewebeschnitte zur statistischen Analyse extrapoliert werden. Die Massenspektren jeder Gruppe werden exportiert und für die statistische Analyse in ClinProTools 3.0 (Bruker Daltonik GmbH) geladen. Vier Gruppen (High-grade

Meniskusdegeneration, Low-grade Meniskusdegeneration, akute und nicht akute Meniskusläsionen) werden definiert und über die Gruppen ein repräsentatives Massenspektrum gemittelt. Den Workflow der MALDI-TOF/IMS Analyse wird in Abbildung 6 schematisch dargestellt.

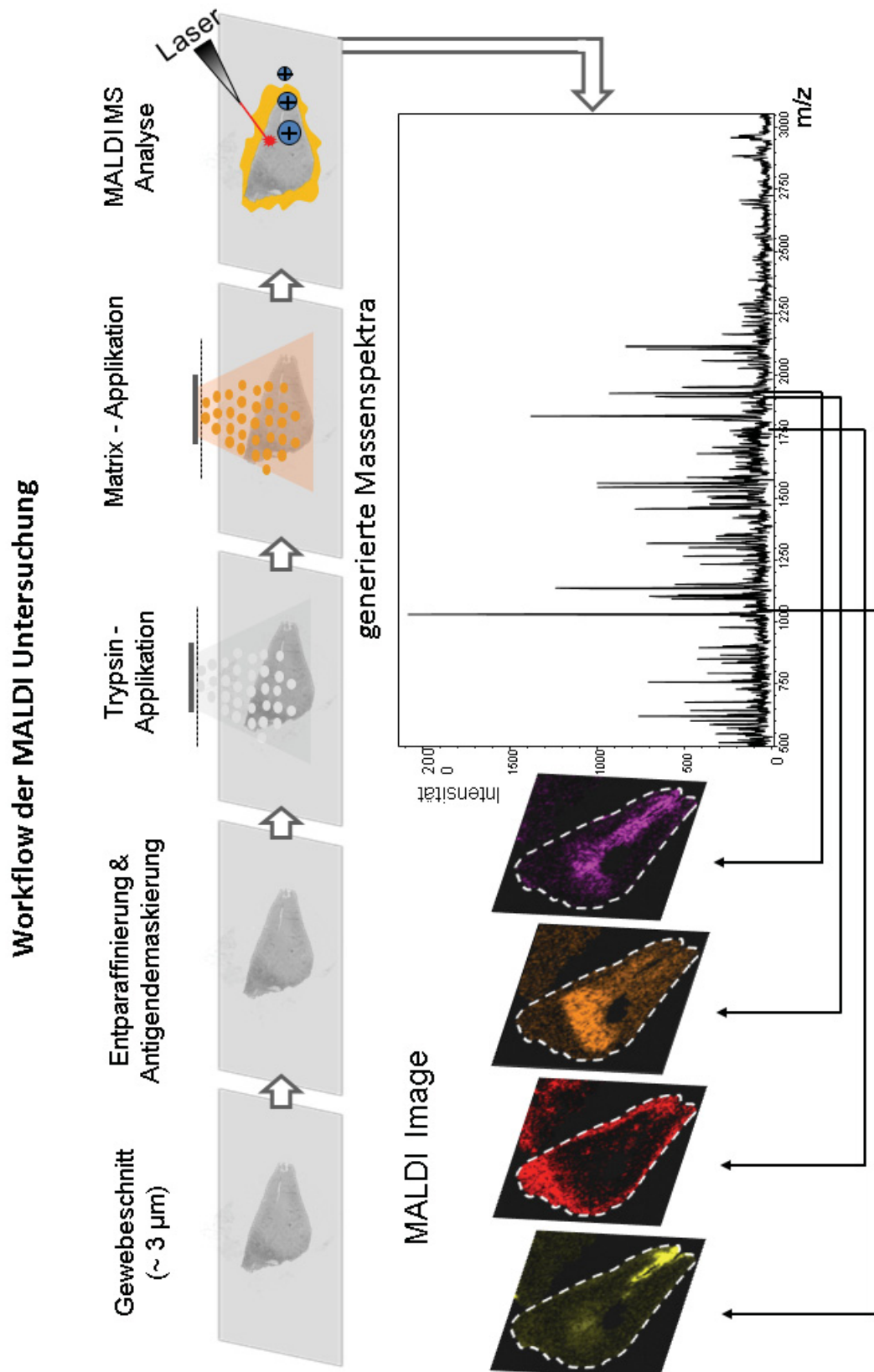


Abb. 6: schematische Darstellung des Workflows der MALDI Untersuchung (72)

2.5.7 Versuchsablauf

Aus den Meniskuskewebeproben von 68 Patienten werden insgesamt 96 Gewebsschnitte angefertigt. Nach histopathologischer Beurteilung und Markierung der entsprechenden Gewebeschädigung (High-grade Degeneration, Low-grade Degeneration, akute und nicht akute Meniskusküläsion) durch 2 Pathologen (J. K. und M. O.) erfolgt die Analyse mittels MALDI-TOF Imaging.

Durch statistischen Vergleich mittels Wilcoxon/Kruskal-Wallis Test (PWKW) können Masse/Ladungsverhältnisse zwischen 600-2393 Da und einem zuvor definierten 2fachen Intensitätsunterschied als Marker für die Gruppe High-grade vs. Low-grade Degeneration (n=8) und für die Gruppe akuter vs. nicht akuter Meniskusküläsion (n=20) festgelegt werden. Anhand dieser Daten kann ein Klassifikationsalgorithmus (Prädiktionsmodell) zur Unterscheidung von High-grade und Low-grade Degeneration unter Zuhilfenahme einer Support Vector Machine erstellt werden. Der ermittelte Klassifikationsalgorithmus wird anschließend auf ein Trainingstestset angewandt und ausgewertet.

Diese Prozedur wird sowohl für die Unterscheidung von High-grade und Low-grade Degenerationen als auch für die Unterscheidung zwischen akuten und nicht akuten Meniskusküläsionen angefertigt. Während der MALDI-Analyse werden neben den Masse/Ladungsverhältnissen der Peptide auch die Molekülmassen ermittelt. Unter Zuhilfenahme der ermittelten Daten und der aktuellen Studienlage hinsichtlich biochemischer Vorgänge die Meniskuskdegeneration betreffend, erfolgt ein Abgleich in der Proteindatenbank SwissProt.

2.6 Statistik

Eine Klassifikation zur Unterscheidung von Low-grade versus High-grade bzw. akuter und nicht akuter Meniskusdegeneration kann durch differenziell exprimierte Masse/Ladungsverhältnisse durch statistischen Vergleich mittels Wilcoxon/Kruskal-Wallis Test und einem zuvor definierten durchschnittlich zweifach erhöhten Intensitätsunterschied festgelegt werden.

2.7 Verbrauchsmaterial

2.7.1 Verbrauchsmaterial Hämatoxylin-Eosinfärbung

Material	Hersteller
Xylol	PathoMed GmbH Viersen, Deutschland
Ethanol	PathoMed GmbH, Viersen, Deutschland
Hämatoxylin-Lösung nach Cill III	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Eosin Lösung	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland
Isopropanol	PathoMed GmbH, Viersen, Deutschland
Kernechtrot	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Aluminiumsulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Hexacyanoferrat II	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
HCL	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

2.7.2 Verbrauchsmaterial Berliner-Blau Reaktion

Material	Hersteller
Kaliumhexocyanoferrat II Trihydrat	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kernechtrot	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	PathoMed GmbH, Viersen, Deutschland
Xylol	PathoMed GmbH, Viersen, Deutschland

2.7.3 Verbrauchsmaterial Alcianblau-Färbung

Material	Hersteller
Alcianblau	Waldeck, Münster, Deutschland
Essigsäure	VWR, Darmstadt, Deutschland
Perjodsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Schiff'sche Reagenz	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Hämalaun nach Harris	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
HCL 25%	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Propanol	PathoMed GmbH, Viersen, Deutschland
Ethanol	PathoMed GmbH, Viersen, Deutschland
Xylol	PathoMed GmbH, Viersen, Deutschland
Thymolkristallin	Waldeck GmbH, Münster, Deutschland

2.7.4 Verbrauchsmaterial MALDI-TOF-Analyse

Material	Hersteller
Angiotensin II	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland
Angiotensin I	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland
Substanz P	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland
Bombesin	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland
Adrenocorticotropik Hormon Clip 1-17	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland
Adrenocorticotropik Hormon Clip 18-39	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland
Somatostatin 28	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland
Alpha-cyano-hydroxy- Zimtsäure	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland
Ammoniumbicarbonat	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland
HPCL grades acetonitrile (CAN)	Fischer Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Trifluoressigsäure (TFA)	Fischer Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Trizma Base	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin Gold	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Autospeed TOF/TOF Massenspektrometer	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland
Imageprep Device	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland
Objektträger (Indiumtin oxide beschichtet)	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland

2.7.5 Sonstiges Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Paraffin	Sasol, Hamburg, Deutschland
Aqua dest	Destillationsanlage (Fa. ELGA) des MVZ Trier, Deutschland
Formalin Lösung 4%	PathoMed, Viersen, Deutschland
Arthroskopiegerätschaft	Fa. Storz, Tuttlingen, Deutschland
NaCL-Lösung Arthroskopie	Fa. Braun, Melsungen, Deutschland
Lichtmikroskop	Fa. Carl-Zeiss, Jena, Deutschland

3 Ergebnisse

3.1 Klassifikation zwischen High-grade und Low-grade Meniskusdegeneration

Zunächst werden massenspektrometrische Profile von Gewebeproben aus zwei „gematchten“ Paaren, bestehend aus High-grade und Low-grade Degeneration (n=24), im selben Individuum als Trainingssets genutzt, um ein Klassifikationsmodell zu entwickeln. Dieses Klassifikationsmodell unterscheidet zwischen Arealen unterschiedlicher Meniskusdegeneration. Areale für High-grade und Low-grade Degeneration werden hierfür zuvor von 2 Pathologen gesichtet und die jeweilige Region markiert. Anschließend erfolgt die Analyse im MALDI-TOF Massenspektrometer mit manueller Peakauswahl für die jeweilige Gruppe.

Die Marker-Masse/Ladungsverhältnisse zwischen 600-2393 Da (n=8) können durch statistischen Vergleich mittels Wilcoxon/Kruskal-Wallis (PWKW)-Test und einem zuvor definierten durchschnittlich zweifach erhöhten Intensitätsunterschied determiniert werden. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 4 dargestellt.

Peptid m/z	AVG Intensität der Gruppe		PWKW
	High-grade Degeneration	Low-grade Degeneration	
1926,2	3,73	1,85	0.00567
1349,8	3,11	1,72	0.00567
656,3	2,55	1,41	0.00567
1913	2,55	1,49	0.00567
1927,1	4,5	1,94	0,0069
1913,9	2,64	1,52	0.0131
603,2	7,99	3,74	0.014
1151,6	4,17	2,33	0.131

Tabelle 4: zeigt n=8 ermittelte (Marker)Spektra von Masse/Ladungsverhältnisse für Low-grade und High-grade Meniskusdegenerationen, basierend auf den ermittelten Daten (72)

Der Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Test (PWKW) zeigt statistisch signifikante Unterschiede für Peaks mit den Masse/Ladungsverhältnissen 1349.8; 1913; 1913.9, 1926.2 und 1927.1 zwischen beiden Gruppen. Eine graphische Darstellung erfolgt in Abbildung 7.(72)

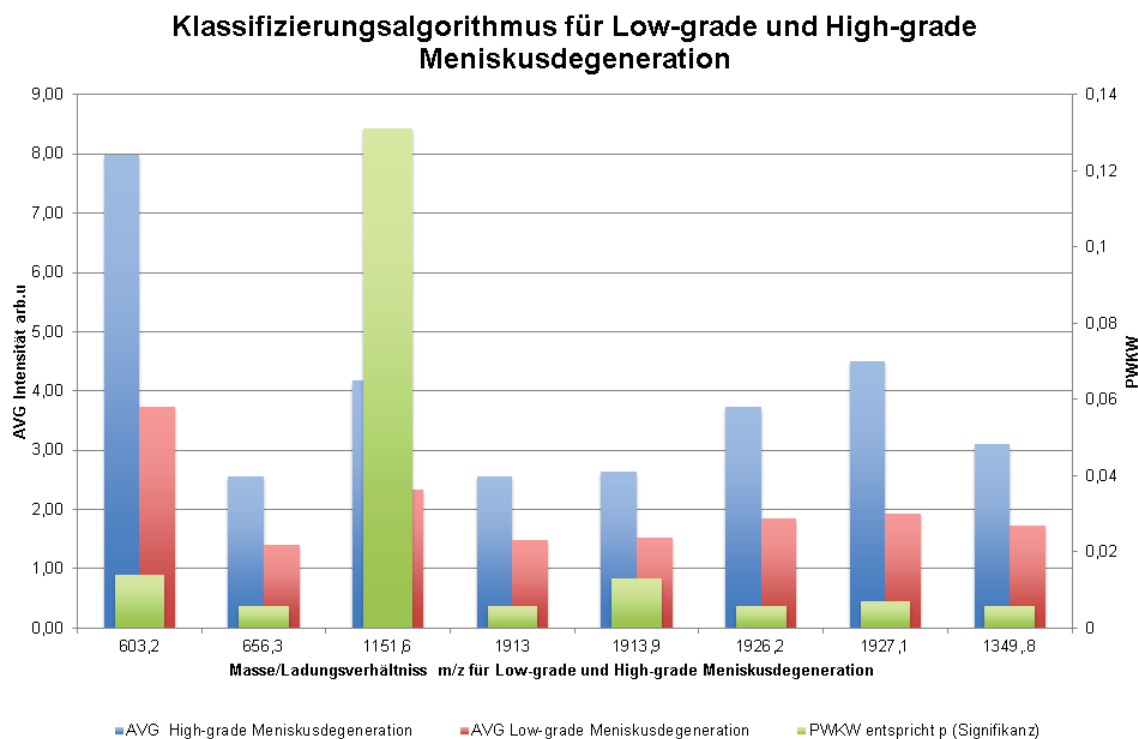


Abb. 7: graphische Darstellung der ermittelten Masse/Ladungsverhältnisse m/z für Low-grade und High-grade Meniskusdegeneration

Durch den Export der Daten in FlexImaging (Bruker Daltonik GmbH) kann die Klassifikation farbkodiert visualisiert und graphisch dargestellt werden (Abbildung 8). Die rote Farbe stellt Areale mit High-grade Degeneration und die grüne Farbe Regionen mit Low-grade Degeneration dar.

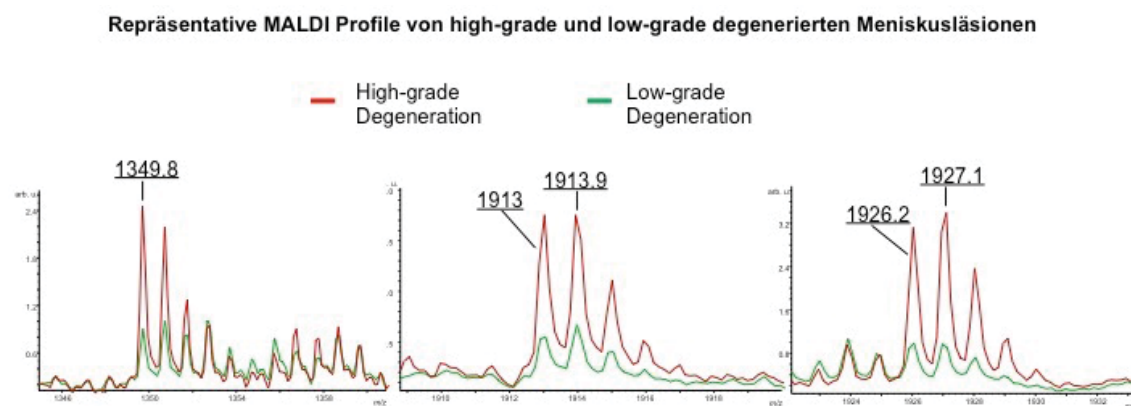


Abb. 8: Die Abbildung stellt repräsentative Überlagerungsbilder durchschnittlicher Spektren von Meniskusproben (n=24) mit Low-grade und High-grade Degeneration dar. Low-grade Degeneration sind grün markiert, High-grade Degenerationen sind rot markiert. Peaks mit folgenden Masse/Ladungsverhältnissen zeigen statistische signifikante Unterschiede für beide Gruppen: 1349,8; 1913; 1913,9; 1926,2 und 1927,1 arb.u. (72)

Mithilfe einer Support Vector Machine (SVM) konnte ein Klassifizierungsalgorithmus erstellt werden. Im Prädiktionsmodell konnten 8 von 9 High-grade Meniskusdegenerationen (88,8%) und 15 von 15 Low-grade Meniskusdegenerationen (100%) korrekt klassifiziert werden (Tabelle 5).

Prädiktionsmodell	Gewebsproben	Korrekt	Inkorrekt	%
High-grade Degeneration	9	8	1	88,8
Low-grade Degeneration	15	15	0	100

Tabelle 5: Prädiktionsmodell für High-grade und Low-grade Degeneration

Das Prädiktionsmodell lief gegen alle Spektren eines Testsets (n=24). 170/222 Spektren (76,6%) und 295/345 (85,5%) können korrekt klassifiziert werden (Tabelle 6).

Testset	Spektren gesamt	Korrekt	Inkorrekt	%
High-grade Degeneration	222	170	52	76,6
Low-grade Degeneration	345	295	50	85,5

Tabelle 6: die Auswertung der Testsets (n=24) für High-grade und Low-grade Meniskusdegeneration und die Analyse der gemessenen Spektren

Die massenspektrometrischen Bilder der Low-grade und High-grade degenerierten Areale sind in guter Übereinstimmung mit der histopathologischen Einordnung unter Anwendung konventioneller Techniken und Verwendung des von Krenn et al vorgeschlagenen Degenerationsscore für Faserknorpel in High-grade und Low-grade Degeneration. Neben der Darstellung von Spektren kann durch die Verwendung des MALDI-TOF-Imaging, eine Visualisierung (Imaging) der Schäden im Gewebe erfolgen (siehe Abbildung 9).

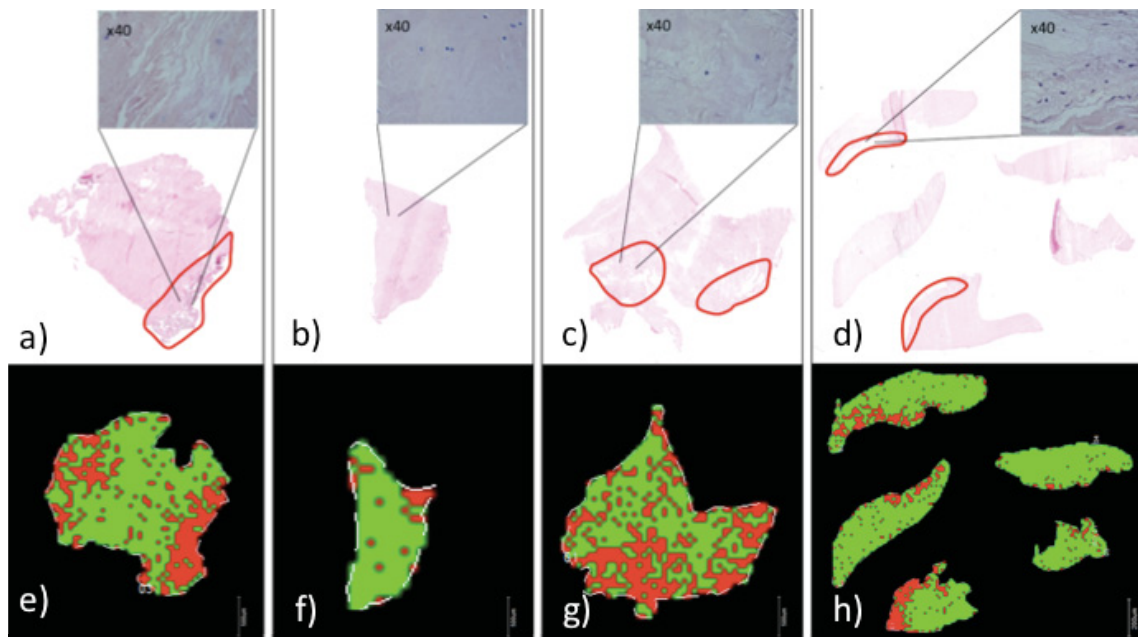


Abb. 9: zeigt 4 HE gefärbte Gewebsschnitte mit 40facher Vergrößerung von vier verschiedenen Patienten mit High- und Low-grade Meniskusdegenerationen. Die entsprechenden Areale werden von einem Pathologen digital markiert (rote Linie). Die vergrößerten Ausschnitte zeigen die deutliche histologische Degeneration (a-d). Die Abschnitte e-h zeigen visualisierte (Imaging) Ausschnitte von massenspektrometrischen Aufnahmen. Rote Areale entsprechen der High-grade Degeneration, grüne Areale entsprechen der Low-grade Degeneration. (72)

3.2 Klassifikation zwischen akuter (frischer Rissbildung) und nicht-akuter Meniskusdegeneration

Analog wurde ein Klassifikationsmodell zur Unterscheidung zwischen traumatischer (akuter) und High-grade als auch Low-grade Meniskusdegeneration (nicht akuter) erstellt. Der SVM-Algorithmus (Prädiktionsmodell), bestehend aus insgesamt 20 m/z Spezies, wird durch statistischen Vergleich der Peaks des Trainingssets (10 akute gegen 10 verschiedene nicht akute Fälle) erstellt. Eine Liste aus Markern (n=20) konnte mit einer Genauigkeit von 100% statistisch signifikant zwischen beiden Gruppen diskriminieren.

Tabelle 7 zeigt ermittelte Peptide zur Unterscheidung von akuten und nicht-akuten Meniskusschäden. Klassifizierungsalgorithmus der Masse/Ladungsverhältnisse (m/z) für akute und nicht akute Meniskusschäden.

Peptid m/z	AVG Intensität nicht-akute Meniskusdegeneration	AVG Intensität akute Meniskusdegeneration	PWKW
759,4	4,16	1,91	0.00182
904,5	1,58	3,04	0.00021
980,4	2,70	1,42	0.00140
1032,6	2,48	11,02	0.00046
1038,5	2,65	1,41	0.00265
1110,5	3,28	1,78	0.04630
1287,6	1,71	1,49	0.00432
1424,6	1,90	1,44	0.00952
1501,7	3,26	1,84	0.01580
1572,6	2,24	1,35	0.00076
1607,8	1,91	1,48	0.08570
1608,8	1,83	1,43	0.01970
1625,8	2,12	1,53	0.00952
1626,8	2,11	1,50	0.00620
1637,8	1,98	1,53	0.01300
1646,7	1,71	1,36	0.08570
1926,1	2,11	1,50	0.00620
1950,9	1,38	2,60	0.00133
1951,9	2,84	1,33	0.00731
1774,8	1,87	1,40	0.00731

Tabelle 7: ermittelte (Marker)Peptide für akute und nicht akute Meniskussläsionen (72)

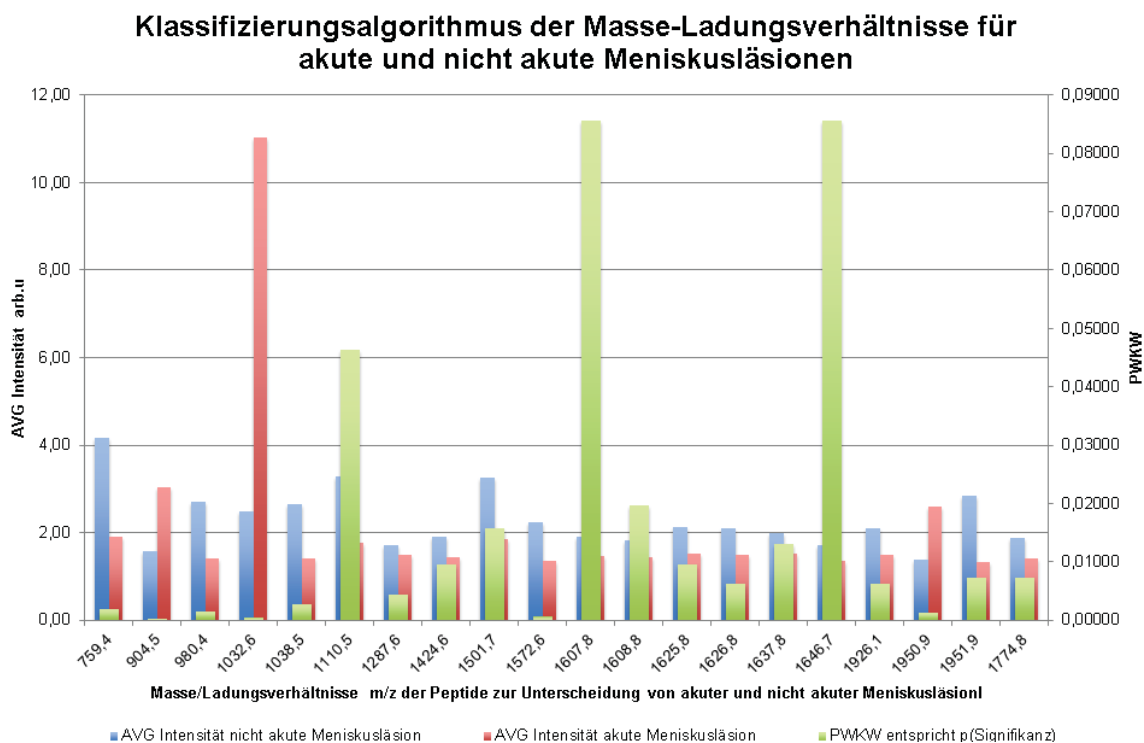
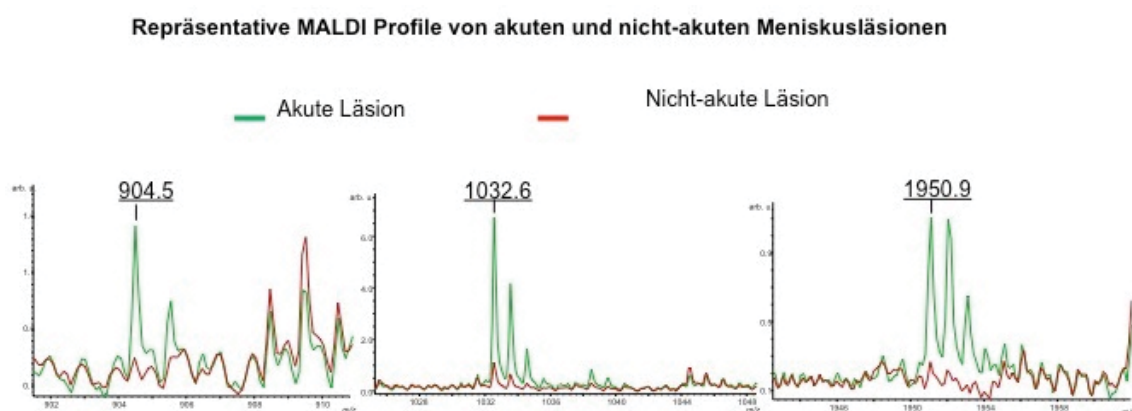


Abb. 10: graphische Darstellung der ermittelten (Marker)Masse/Ladungsverhältnisse m/z für akute und nicht akute Meniskusläsionen



In Abb. 11 werden repräsentative Überlagerungsbilder durchschnittlicher Spektren von Meniskusproben mit akuter (grün) und nicht akuter (rot) Läsionen dargestellt. Peaks mit folgenden Masse-Ladungsverhältnissen (m/z) zeigen statische signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen: 904,5; 1032,6 und 1950,9 arb.u (72)

Der SVM-Algorithmus (Prädiktionsmodell) bestehend aus 20 m/z Spezies (10 akute versus 10 verschiedene nicht akute Fälle) konnte unter Zuhilfenahme der ermittelten Marker (Tabelle 8) mit einer Genauigkeit von 100% statistisch signifikant zwischen beiden Gruppen unterscheiden.

Prädiktionsmodell	Gewebsproben	Korrekt	Inkorrekt	%
akute Meniskusläsion	10	10	0	100
nicht akute Meniskusläsion	10	10	0	100

Tabelle 8: Prädiktionsmodell (n=20) für akute und nicht akute Meniskusläsionen

Der mit Hilfe von Support Vector Maschine ermittelte Klassifizierungsalgorithmus läuft gegen alle Spektren eines Testsets für akute und nicht akute Meniskusläsionen (n=27). Bei der Analyse der gemessenen Daten werden für die akuten Meniskusläsionen (n=5) 109 Spektren ermittelt, wovon 40 korrekt klassifiziert werden. Im Falle der nicht akuten Meniskusläsionen (n=22) werden 530 Spektren ermittelt, hiervon werden 414 korrekt klassifiziert.

Testset	Spektra gesamt	Korrekt	Inkorrekt	%
akute Meniskusläsion	109	40	69	36,7
nicht akute Meniskusläsion	530	414	116	78,1

Tabelle 9: Testset (n=27) für akute und nicht akute Meniskusläsionen

Die massenspektrometrischen ermittelten Daten von nicht akuten Arealen sind in guter Übereinstimmung mit der histopathologischen Einordnung unter Anwendung konventioneller Techniken.

Neben der Darstellung von Spektren kann durch die Verwendung des MALDI TOF Imaging, eine Visualisierung (Imaging) der Schäden im Gewebe erfolgen (siehe hierzu Abbildung 11).

Die Abb. 12 zeigt nochmals 4 Meniskusproben von verschiedenen Patienten mit akuten und nicht akuten Läsionen. Auch hier werden geschädigte Areale in jedem Schnitt von einem Pathologen digital markiert (rote Linie). Die Areale im oberen Bild zeigen den histomorphologischen Aspekt. Die massenspektrographisch erfassten und visualisierten Gewebeschnitte zeigen nicht akute Läsionen in grün und akute Läsionen sind in rot dargestellt.

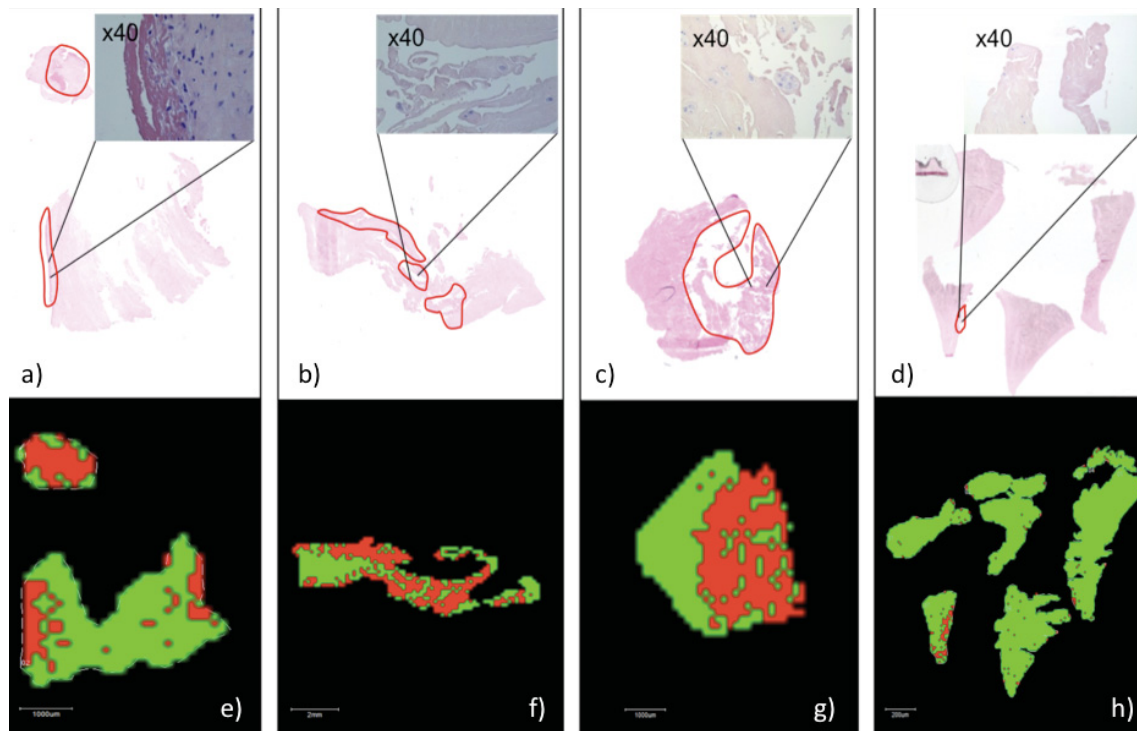


Abb. 12: Darstellung von 4 HE-Gewebeschnitten (a-d) und MALDI-TOF-Imaging Aufnahmen (e-g) für akute und nicht akute Meniskusläsionen (72)

3.3 Datenabgleich mit SwissProt Database

Unter Kenntnis der aktuellen Studienlage zu biochemischen und physiologischen Vorgängen den veränderten Meniskus betreffend, erfolgt die SwissProt Database Recherche anhand der zuvor bestimmten Molekülmasse der gemessenen Masse/Ladungsverhältnisse für High-grade und Low-grade Meniskusdegenerationen (Tabelle 10) und akute und nicht akute Meniskusläsionen (Tabelle 11).

Peptid m/z	Molekulares Gewicht
1926,2	1,246172413
1349,8	1,301435429
656,3	1,103384427
1913	1,206595108
1927,1	1,214566527
1913,9	1,17012007
603,2	1,242583315
1151,6	1,280362918

Tabelle 10: gemessene molekulare Gewichte der Masse/Ladungsverhältnisse für High-grade und Low-grade Meniskusdegeneration (72)

Peptid m/z	Molekulares Gewicht
759,4	1,105192879
904,5	0,681840429
980,4	0,781004598
1032,6	0,84184041
1038,5	0,411627128
1110,5	0,378894776
1287,6	0,961174502
1423,6	0,641941936
1501,7	0,135382673
1572,6	0,790139583
1607,8	0,265542811
1608,8	0,469201212
1625,8	0,413109858
1626,8	0,581145085

Peptid m/z	Molekulares Gewicht
1637,8	1,083961991
1646,7	0,786770387
1774,8	0,418992588
1926,1	0,070231488
1950,9	0,76849337
1951,9	0,92382016

Tabelle 11: zeigt die massenspektrographisch ermittelten molekularen Gewichte für Proben von akuten und nicht akuten Meniskusläsionen (72)

Unter Zuhilfenahme der SwissProt Database können anhand der Masse/Ladungsquotienten und den ermittelten molekularen Gewichten folgende prädiktive Peptide recherchiert werden (Tabelle 12).

m/z	Molekulares Gewicht	Prädiktives Peptid/Protein
1423.6	0,6419419358	Kollagen Typ II
1625.8	0,413109858	Kollagen Typ II
759.4	1,105192879	Kollagen Typ VII
1951.9	0,92382016	Kollagen Typ VII
1287.6	0,961174502	Vorläufer Proteoglycan 4
1501.7	0,135382673	Vorläufer Proteoglycan 4
1572.6	0,790139583	Vorläufer Proteoglycan 4
1032.6	0,84184041	MMP-1
1626.8	0,581145085	Fibronectin
1607.8	0,265542811	Fibronectin

Tabelle 12: Die dargestellten Masse/Ladungsquotienten können in der SwissProt Database recherchiert werden.

4 Diskussion

Ist das MALDI-TOF-Imaging Verfahren ein geeignetes Verfahren für die histologische Meniskusdiagnostik? Kann eine untersucherunabhängige Objektivierung der Meniskusdiagnostik durch das MALDI-TOF-Imaging Verfahren erreicht werden? Mit diesen Fragestellungen hat sich die vorliegende Arbeit beschäftigt und unter Anwendung der vorab beschriebenen Methoden untersucht. Die Ergebnisse und Methoden sollen nun im folgenden Kapitel kritisch diskutiert werden.

4.1 Beurteilung der Methoden

4.1.1 Gewinnung der Proben durch Kniegelenksarthroskopie

Kniegelenksarthroskopien sind die am häufigsten durchgeführten Operationen in der Orthopädie (73). Laut Statistischem Bundesamt unterzogen sich im Jahr 2012 151 000 männliche und 146 000 weibliche Patienten einer Kniegelenksarthroskopie (74). Demnach war die Arthroskopie am Gelenkknorpel und an den Menisken die 3. häufigste bei männlichen Patienten und die 4. häufigste Operation bei weiblichen Patienten (74). Degenerative und traumatische Meniskusläsionen zählen somit zu den häufigsten orthopädischen Krankheitsbildern (50). Aufgrund der komplexen Biomechanik des Kniegelenks führen kleinste Änderungen zum strukturellen Umbau und fördern die Entstehung einer Kniegelenksarthrose (60, 75, 76, 77). Im Jahre 1948 wurde die Bedeutung der Menisken bereits von Fairbank beschrieben (78).

Wegen dieser komplexen Folgeerscheinungen werden Meniskusläsionen, sowohl degenerativ als auch traumatisch, nur durch eine sparsame arthroskopische Resektion oder Refixation therapiert (10).

Dem Pathologen stehen meist nur sehr kleine (5-20 mm) und aus dem Verbund gelöste Meniskusfragmente zur Begutachtung zur Verfügung. Neben Angaben zur Person, zum Alter und Geschlecht sind Angaben zur Art des Traumas, zum intraoperativen Befund und zur Entnahmestelle essentielle Informationen für die histopathologische Begutachtung (10, 60, 79).

Im Hinblick auf eine gutachterliche Stellungnahme im Rahmen von Berufsgenossenschaftlichen Verfahren (BG) ist es wichtig zwischen traumatischen und degenerativen Schädigungen zu unterscheiden. „Für diese objektive Bewertung ist der histologische Befund beweisend“ (60).

In der orthopädischen Chirurgie gehört die Kniegelenksarthroskopie zu den wichtigsten Eingriffen, da sowohl diagnostisch als auch direkt therapeutisch vorgegangen werden kann. In der Diagnostik von meniskalen und ligamentären Verletzungen des Knieinnenapparates zählt die Arthroskopie zum Goldstandard (80,81,82).

Neben gleichzeitiger Diagnostik und Therapiemöglichkeiten bietet die Arthroskopie des Kniegelenkes im Vergleich zu offenen Techniken verschiedene Vorteile, wie schnellere Regeneration, geringere Schmerzen und ein niedrigeres Risiko für Infektionen und Arthrofibrose. Patienten können somit postoperativ schneller in den Alltag zurückkehren (82).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte die Gewinnung der Meniskusgewebeproben anhand einer Kniegelenksarthroskopie. Die Gewebsentnahme und Probengewinnung war gleichzeitig die Therapie nach Goldstandard der zuvor diagnostizierten Meniskusläsionen. Ein Risiko für die Entstehung und das Voranschreiten der Osteoarthrose gilt es zu vermeiden, daher wurde die vollständige Menishektomie zu Untersuchungszwecken zu keinem Zeitpunkt in Betracht gezogen. Laut Fissler und Müller erlauben auch, „arthroskopisch“ entnommene Meniskusproben zuverlässige histopathologische Aussagen zum Ausmaß der Degeneration und zur Altersbestimmung traumatisch bedingter Läsionen (60).

4.1.2 Die Verwendung von Klassifikationsmodellen

In der vorliegenden Arbeit wurden Klassifikationsmodelle der Degeneration in Low-grade und High-grade Degeneration sowie akute (traumatische) und nicht akute Meniskusläsionen erstellt. Die Einteilung in Low-grade und High-grade Degeneration bezieht sich auf die von Krenn vorgeschlagenen Kriterien zum Histopathologischen Degenerations-Score des Faserknorpels (58). Hierbei handelt es sich um „... eine Bewertungsmethode auf der Basis einer 3-fachen Gleitskala, die sich an aus der täglichen Diagnostik bekannten charakteristischen morphologischen Veränderungen des Meniskusgewebe orientiert.“ (58).

Zur Beurteilung von Meniskusgewebe stehen verschiedene Scoring-Systeme zur Verfügung. Die Wesentlichen, wie Copenhaver Classification, Mankin Score, Zhang Score, um nur einige zu nennen, wurden von Longo et al (8) hinsichtlich ihrer Anwendung vor allem auf wissenschaftlichem Gebiet und zu spezifischen Fragestellungen untersucht. Die verschiedenen Scoring-Systeme berücksichtigen jeweils unterschiedliche Aspekte in der Struktur und Texturveränderung im Meniskusgewebe. Eine standardisierte, objektive Beurteilungsskala fehlt bis dato (56).

Ein wesentlicher Punkt eines diagnostischen Verfahrens sollte die Reproduzierbarkeit eines Ergebnisses durch den untersuchenden Arzt sein (6, 56). Für eine gute Übereinstimmung der Interrater-Reliabilität von meist 2 Untersuchungen spricht ein Kappa-Koeffizient von 0,81-1.0 (83, 84). In seiner Auswertung erreicht Krenn et al Kappa-Werte zwischen 0,93 und 1.0 (6). Hempfling und Krenn (85) postulieren ein zweistufiges Graduierungssystem in Low-grade und High-grade Texturstörungen von bradytrophem Gewebe, welches sowohl die Matrixveränderungen als auch zellulären Veränderungen erfasst.

Des Weiteren soll beachtet werden, dass sich die Einteilung von Gewebsveränderungen in High-grade und Low-grade sowohl für entzündliche als auch für neoplastische Erkrankungen in der Pathologie seit einigen Jahren etabliert hat (58). So schlägt die Weltgesundheitsorganisation z.B. eine Graduierung von Urothelkarzinomen, neuroendokrinen Tumoren oder serösen Ovarialkarzinomen in Low- bzw. High-grade Neoplasien vor (86, 87, 88).

4.1.3 Die Anwendung des MALDI-TOF Imaging Verfahrens in der histopathologischen Diagnostik

Um den operativ gewonnen Eindruck des Meniskusgewebes zu komplettieren, soll, vor allem wenn es sich um ein berufsgenossenschaftliches Verfahren handelt, eine histopathologische Diagnostik erfolgen (79). Unter Anwendung von minimalinvasiven Techniken stehen oft nur sehr kleine Gewebeproben zur Verfügung. Dem Untersucher fehlen oft „gesunde“, rissferne Meniskusanteile zur vergleichenden Diagnostik. Zwei Voraussetzungen sind notwendig, um den maximalen Informationsgehalt aus den kleinen Meniskusfragmenten zu erhalten: zum einen umfassende klinische Angaben, zum anderen eine objektive standardisierte histopathologische Diagnostik (60). Vor allem für die Beantwortung von gutachterlichen oder versicherungsmedizinischen Fragestellungen sind klinische Angaben neben der histopathologischen Untersuchung essentiell, um ein medizinisches Fachgutachten erstellen zu können (10). Laut Fisseler-Eckhoff sind folgende klinische Angaben unbedingt notwendig, um physiologische Texturstörungen von pathologischen Veränderungen abzugrenzen und damit eine aussagekräftige und in einem versicherungsmedizinischen Gutachten verwertbare pathologische Begutachtung abgeben zu können (10, 60):

- Angaben zu Person, Alter und Geschlecht
- konkrete Fragestellungen des anfordernden Arztes wie z.B. das Ausmaß der Degeneration

- Angaben zur Art des Traumas
- Angaben zum intraoperativen Befund und zur Entnahmestelle der Gewebeproben.

Neben klinischen Angaben ist die Kenntnis und Abgrenzung physiologischer Veränderungen, sogenannter Texturstörungen, die unter dem Begriff der „Meniskusdegeneration“ zusammengefasst werden, von Bedeutung. Diese müssen von dem untersuchenden Facharzt für Pathologie von den altersuntypischen Texturstörungen abgegrenzt werden (10). Zu diesen Kriterien zählen (10):

- örtliche Kernverarmung mit Verminderung der Chondrozytenzahl
- Reduktion der Doppelbrechung der Fasern in der polarisationsoptischen Untersuchung
- Verminderung der Gefäßdichte
- umschriebene asbestartige Degeneration
- Basophilie
- feintropfige Ablagerungen sudanophiler Substanzen
- Pseudoknorpelproliferate
- Ausbildung von Pseudoknorpelzellhaufen
- eine schleimig erscheinende Interzellulärsubstanz (mukoide Degeneration)
- Abnahme des Quellungsvermögens der Kittsubstanzen mit diffuser Verfettung, Gelbfärbung des Meniskus

Zur Detektion von Gewebsveränderungen im Meniskusgewebe stehen dem untersuchenden Pathologen neben der Hämatoxylin/Eosinfärbung, histochemische Methoden, wie die Berliner-Blau Reaktion zur Detektion von Hämosiderinablagerungen, die Alcianblaureaktion zum Nachweis von Glykosaminoglykane und die Elastica van Giesson und Goldner Färbung für die Darstellung von Bindegewebe zur Verfügung. Polarisationsoptische, immunhistochemische Methoden und elektronenmikroskopische Verfahren kommen außerdem zur Anwendung und können so zur Präzisierung der histologischen Befunde beitragen. Alle Verfahren lassen jedoch immer Interpretationsspielräume (8, 9).

Neben Low-grade und High-grade Degeneration müssen traumatisch bedingte Meniskuläsionen unterschieden werden. Traumatische Meniskuläsionen setzen immer ein adäquates Trauma voraus und können histologisch bezüglich ihres Alters in 3 Phasen eingeteilt werden (10, 88, 90).

- **Phase 1:**
7 Tage: flammenzungenartige Rissbildung, Ödem, Fibrin; 2 bis 5 Wochen verplumpte Zotten (Glättung) (10)
- **Phase 2:**
4 bis 5 Wochen: fibrozytenreiches Granulationsgewebe, 7 bis 12 Wochen fibroblastenreiches Narbengewebe, Pseudoknorpelzellproliferate (10)
- **Phase 3:**
nach 5 Monaten Narbengewebe bis zur Restitution (10)

Betrachtet man die Komplexität der histopathologischen Beurteilung und die verschiedenen Beurteilungsskalen von Meniskusk Geweben, so scheint es wichtig die histopathologische Beurteilung von Meniskusk Gewebe zu vereinheitlichen und deren Ergebnisse reproduzierbar zu machen (58). Hierfür wird ein objektives Verfahren benötigt. In der vorliegenden Arbeit wurde neben histopathologischer Diagnostik, die MALDI-TOF Analyse angewandt. Als Grundprinzip wird das zu untersuchende Gewebe mit einer Matrix überschichtet, um eine „Flugfähigkeit“ von Ionen nach Laserapplikation auf biologische Strukturen zu erzielen. Seit Einführung dieser Methode in den 1980er Jahren hat sich das Verfahren technisch ständig weiterentwickelt, zurzeit beträgt die laterale Auflösung 10-100 µm (12, 15). Die Methode hat sich im Laufe der Jahre als schnell, akkurat und kosteneffizient erwiesen (91). Mit Einführung der MALDI-TOF- Imaging Methode ist es nun möglich in situ Analysen an dünnen Gewebsschnitten durchzuführen (92).

Interessant ist neben dem Erhalt von massenspektrometrischen Daten eine Korrelation der Protein- und Peptidstrukturen im Gewebe (12, 92, 93, 94). Seit einigen Jahren ist es möglich mittels MALDI-TOF Proteine direkt im Gewebe zu detektieren und auch räumlich im Gewebe darzustellen (11, 93, 94). Mit der Entwicklung von neuen Antigen-Demaskierungstechniken kann das Verfahren nicht nur an Gefrierschnitten sondern auch an in Paraffin gebetteten Gewebeschnitten angewandt werden (15), welches die Anwendung im klinischen Gebrauch deutlich erleichtert (11). Angewandt am Gefrier- gewebe kann eine Vielzahl von Molekülen, darunter Proteine, Peptide, Lipide und Metaboliten mit dieser Methode visualisiert dargestellt werden. Aufgrund der Verwendung von organischen Lösungsmitteln ist bei in Paraffin gebettetem Gewebe nur die Analyse von Proteinen möglich (15).

In verschiedenen Publikationen zu Magenkarzinomen, Myxoiden Sarkomen oder Mamma-Karzinomen wurden Proteinsignaturen mit MALDI-TOF-Imaging nachgewiesen. Ebenso existieren bereits Studien, die sich mit Verteilung und Metabolismus von

Medikamenten in Organsektionen unter Anwendung des Verfahrens beschäftigen (89). In einer weiteren Studie gelang der Nachweis von spezifischen Biomarkern in rheumatoid und arthrotisch verändertem Gewebe (12, 13).

Der Nachweis von spezifischen Proteinen oder Peptidstrukturen durch MALDI-TOF-Imaging im degenerativ oder traumatisch geschädigten Meniskusgewebe ist daher denkbar.

Trotz aller Vorteile dieses Analyseverfahrens müssen ein eingeschränkter Analysebereich zwischen 2000 und 80000 Da (122), sowie hohe Anschaffungskosten von Apparatetechnik und Software diskutiert werden. Zusätzlich sind spezielle Kenntnisse in der Anwendung erforderlich (12, 122).

4.1.4 Die Verwendung von Support Vector Machines

In der vorliegenden Arbeit konnten die ermittelten Spektren High- und Low-grade Degenerationen sowie akute und nicht akute Läsionen den Meniskusregionen zugeordnet werden. Hierfür werden die ermittelten Daten mittels Support Vector Machines (SVM) Klassifikationsmodellen zugeordnet (95, 96).

Dabei handelt es sich um ein mathematisches Verfahren der Mustererkennung (97). Diese Methode des maschinellen Lernens wurde 1998 von Vapnik beschrieben (98). Support Vector Machines ermöglichen aus Trainingsdaten selbständig Gesetzmäßigkeiten zu erlernen und diese dann für die spätere Klassifizierung zu nutzen (99, 100). „Dieser Prozess hat das Ziel aus den Trainingsdaten möglichst generalisierend Zusammenhänge derart abzuleiten, dass der Klassifizierer zu einem späteren Zeitpunkt unbekannte Daten mit geringst möglichen Fehlern klassifizieren kann“ (95, 100, 101).

Jedes Objekt (gemessene Daten) wird durch einen Vektor in einem Vektorraum repräsentiert. Die Support Vector Maschine passt eine Hyperebene in den Raum ein, um somit eine Trennfläche zu generieren und die gemessenen Objekte (Daten) in zwei Klassen zu unterteilen (101). Zusätzlich wird ein sogenannter k-NN (k-nearest neighbour) Klassifizierungsalgorithmus verwendet, um die endgültige Klassifizierung zu erreichen (102).

Um in der vorliegenden Arbeit High- und Low-grade Meniskusdegeneration und akute versus nicht akute Meniskusläsionen klassifizieren zu können, werden kombinierte durchschnittliche Spektren für jede Gruppe verwendet. So können Peaks identifiziert werden, welche die jeweiligen Klassen repräsentieren.

Die stärksten Peaks in den gemessenen Spektren werden manuell ausgewählt und als Vergleichswert verwendet.

Die Klassifizierungsmodelle werden mit Hilfe der Support Vector Machine (SVM), basierend auf den Daten der Trainingssets, erstellt. Der SVM Algorithmus für die Klassifizierung von High- und Low-grade Meniskusdegeneration beinhaltet 8 Peaks. Für die Bildung des Klassifikationsmodelles akute Meniskusläsion versus nicht akute Meniskusläsion wurden 20 Peaks verwendet.

Die Auswahl der Peaks in den Trainingssets wird durch den Wilcoxon/Kruskal-Wallis Test und mittels k-NN (k-nearest neighbour) auf 3 festgelegt. Jedes SVM Modell wird für alle Testdatensets, 24 Fälle für High- versus Low-grade Degeneration und 27 Fälle von akuten versus nicht akuten Meniskusläsionen getestet.

In der Literatur findet man eine Vielzahl von Veröffentlichung zur Verwendung von SVM. Neben Anwendungen in der Technik finden sich ebenfalls Publikationen zur Datenauswertung im Bereich der Medizin, Biologie, etc.. So beschreiben Agner SC et al (104) die Anwendung von Support Vector Machines in der Datenauswertung in ihrer Studie zur Identifizierung von Triple-negativ Mamma-Carcinomen mittels MRT und Veronese et al (105) in ihrer Studie „.... Anwendung von Support Vector Machines zur Klassifizierung der Schizophrenie“ die Verwendung von Support Vector Machines.

Eine schnelle Klassifizierung, eine geringe Fehlerwahrscheinlichkeit bei der korrekten Auswahl der Parameter und eine große Effektivität in der Verwendung großer Datenmenge sind Vorteile dieser Methodik (107). Zeitaufwendiges Lernen der „Machine“ und große Datenmengen sind erforderlich um ein Klassifikationsmodell zu erstellen (107). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde ein Großteil der gewonnen Proben benötigt um die Klassifikationsmodelle High-und Low- grade Meniskusdegeneration und akute versus nicht akute Meniskusläsionen zu erlernen. Des Weiteren war bei der Anwendung zu bedenken, dass bei zukünftigen Studien mit neuen Erkenntnissen ein erneutes Training und Erstellung eines Klassifizierungsmodelles erforderlich sein wird (96, 106). Eine wesentliche Fehlerquelle in der Erstellung von Klassifizierungsmodellen kann die manuelle Auswahl der Spektren darstellen. Eine Validierung des Modelles kann helfen diese Fehlerquelle zu vermeiden (105). Trotz einiger Nachteile ist die Anwendung von Support Vector Machines hilfreich und zählt laut Heikamp und Bajorath als bestes, rechnerisch verfügbares Mittel für die biologische und chemische Eigenschaftsvorhersage (108).

4.2 Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Klassifizierungsalgorithmus der Masse/Ladungsverhältnisse für Low-grade und High-grade Meniskusdegeneration und für akute und nicht akute Meniskusläsionen entwickelt.

Im Falle der High-grade degenerierten Regionen konnte das SVM-Modell mit einer Genauigkeit von 88,8%, d.h. 8 von 9 Meniskusbiopsien, und Areale mit Low-grade Degenerationen mit einer Genauigkeit von 100%, d.h. 15 von 15 Meniskusbiopsien, korrekt klassifizieren. Das SVM-Modell lief gegen alle Spektren eines Testsets (n=24). 170/222 (76,6%) Spektren wurden in High-grade degenerierten Regionen korrekt klassifiziert. 295/345 (85,5%) Spektren wurden in Arealen mit Low-grade Degeneration korrekt klassifiziert.

Analog wurde, wie vorab bereits beschrieben, ein Klassifikationsmodell zur Unterscheidung zwischen traumatischer (akuter) und High-grade sowie auch Low-grade Meniskusdegeneration (nicht akuter) erstellt. Der SVM-Algorithmus bestehend aus 20 m/z Spezies wurde durch statistischen Vergleich der Peaks von 10 akuten und 10 nicht akuten Fällen erstellt. Mit einer Genauigkeit von 100% konnte zwischen beiden Gruppen diskriminiert werden. Auch hier lief das Prädiktions-Modell gegen alle Spektren eines Testsets (n=27).

Lediglich bei 40/109 Spektren (36,6%) konnten traumatische (akute) Meniskusläsionen klassifiziert werden. Ursächlich hierfür ist sicherlich das kleine Patientenkollektiv, nur bei 5 von 96 Proben wurden histopathologisch eine frische akute Meniskusläsion diagnostiziert. 414/530 (78,1%) Spektren der nicht akuten Meniskusläsionen wurden korrekt klassifiziert.

Eine Veränderung der Meniskus Anatomie durch Resektion oder partielle Resektion führt zur Veränderung der Kniegelenksbiomechanik und trägt zur Entstehung von Arthrose bei. So wurde in einer prospektiven longitudinalen Studie nachgewiesen, dass ein Drittel der Patienten 30 Jahre nach totaler Meniskusresektion Gelenkspaltverschmälerungen aufwiesen (5, 109). Des Weiteren ergab eine Studie von Higuchi et al (110), dass bei durch partielle Meniskektomie therapierten Kniegelenken in 48% der Fälle Anzeichen von Arthrose nachgewiesen werden konnte. Nach Erkenntnis der essentiellen Bedeutung der Menisken für die Kniegelenksfunktion unterliegt die Therapie von Meniskusverletzungen einem Wandel (48). Auch durch die Einführung neuer Nahtin-

strumente von Firmen wie Arthrex, Smith&Nephew oder Biomet hat sich die Meniskus-chirurgie hin zur Meniskusnaht und damit zum Meniskuserhalt entwickelt (48).

Die meniskuserhaltende Chirurgie ist einer der Gründe für das Vorliegen des kleinen Patientenkollektives mit akuter Meniskusschädigung.

Problematisch erscheint auch, dass traumatische Meniskusschädigungen oft erst nach einer zeitlichen Verzögerung operativ behandelt werden und somit dem Pathologen nicht im akuten Stadium zur Beurteilung vorliegen (10).

Da sich traumatisch bedingte Meniskusveränderungen in 3 verschiedene zeitliche Phasen einteilen lassen (Kap 1.6.), ist eine histologische Aussage über das Vorliegen eines Traumas und dem direkten Zusammenhang einer Meniskusschädigung möglich (10). Mit einer zeitlichen Verzögerung zwischen Trauma und chirurgischen Therapie von 2 Monaten kann eine Aussage sicher erfolgen (10). Erfolgt die Therapie in einer Phase von 2-5 Monaten oder länger, so nimmt die Wahrscheinlichkeit über eine sichere Aussage deutlich ab (10, 90, 88).

Hilfreich in Bezug auf gutachterliche oder versicherungsrechtliche Aussagen über das Vorliegen eines akuten (traumatischen) Meniskusschadens sind ausreichende Kenntnisse zur Anamnese, Klinik und den Grunderkrankungen (10).

4.2.1 Chronische Meniskopathie und traumatische Meniskusläsion

Meniskusgewebe unterliegt als bradytrophes Gewebe Altersveränderungen. Entscheidend ist die Abgrenzung physiologischer zu pathologischen Befunden, die das altersübliche Maß der Degeneration überschreiten (60).

Der Begriff Degeneration wird in der Diagnostik häufig nicht eindeutig verwendet. Hierunter ist laut Krenn et al „... eine strukturelle Störung des Gewebes zu verstehen“ (58). Low-grade Degenerationen treten in der Altersklasse von 20-40 Jahren und mittelgradige Degenerationen in der Altersklasse von 40-80 Jahren auf. Einzuordnen sind diese Befunde im Rahmen der physiologischen Variabilität (6, 10).

Neben degenerativen Veränderungen müssen traumatisch bedingte Läsionen berücksichtigt werden. Schwierigkeiten in der histologischen Untersuchung bereitet die grundsätzliche Frage des Vorschadens bei einem Trauma. Vor allem bei älteren Patienten mit bereits vorliegender physiologischer Meniskopathie ist es schwierig den Zusammenhang zwischen Vorschaden und Trauma zu differenzieren (60).

In der vorliegenden Arbeit wurden Klassifikationsmodelle entwickelt, welche durch Untersuchung mittels MALDI-TOF Imaging zum einem High-grade und Low-grade Degenerationen sowie traumatische (akute) und nicht akute Läsionen in guter Übereinstimmung mit der histopathologischen Analyse klassifizieren. In der nachfolgenden SwissProt Database Recherche konnten einige Molekülmassen der Peptide aus Tab.12 (Kap.3.3) identifiziert werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die gemessenen Spektren ein zuverlässiger Parameter zur Identifizierung der einzelnen meniskalen Gewebsveränderungen sind.

Meniskales Gewebe besteht aus Knorpelgewebe, charakterisiert durch Netzwerke von Kollagenfasern und Zellen, wobei Kollagen Typ I mit 75-90% den größten Anteil darstellt (6, 36, 111, 112).

Durch die radiäre Anordnung in den oberflächlichen Schichten schützen die Fasern das Gewebe vor mechanischem Versagen (36).

Bei der Entstehung von Meniskusläsionen wurde von Arnoczky et al 1992 ein Zusammenhang zwischen Proteoglykanen der Extrazellulär-Matrix und Kollagenfasern diskutiert. Die histopathologische Inspektion der Gewebeproben und Färbung mit Alcianblaufärbung ergab einen stärkeren Verlust von Kollagenfasern in High-grade degenerierten als in Low-grade degenerierten Arealen. Die Analyse von Gewebeproben mit akuten Meniskusläsionen ergab für Masse/Ladungsverhältnisse m/z 1423.6 und 1625.8 (Kollagen Typ II) und m/z 759.4 und 1951.9 (Kollagen Typ VI) eine verminderte Expression im Vergleich zur nicht akuten Meniskusläsionen. An bovinen Menisken konnte Cheung et al 1987 (113) nachweisen, dass Kollagen Typ II vor allem im inneren Drittel des Meniskus, der White-White-Zone, zu finden ist und etwa 60% des Trockengewichtes ausmacht. Kollagen Typ VI dagegen hat einen geringen Anteil am Trockengewicht des Meniskus und macht nicht mehr als 2% aus (114, 115). Kollagen Typ I, welches den Hauptbestandteil an Kollagenen ausmacht, dominiert in der Red-Red-Zone mit 80% des Trockengewichtes, in der White-White Zone hingegen nur in 40% des Trockengewichtes (116). Kollagene spielen für die Funktionalität des Meniskus eine wesentliche Rolle. Durch ihre scheinbar willkürliche Anordnung in der oberflächlichen und lamellären Schicht sowie ihrer zirkumferenten Ausrichtung in der tiefen Schicht sorgen sie für Ringspannung (112). Kollagen Typ VI zählt neben Fibronectin und Thrombospondin zu den Adhäsionsglykoproteinen, welche Matrixbestandteile mit den zellulären Bestandteilen verbinden (111,114).

Diskutiert werden kann, dass eine verminderte Expression dadurch zustande kommt, dass es zu einem abrupten Bruch der Faserkonstruktionen bei einer akuten Meniskusläsion kommt. Des Weiteren ist bekannt, dass Veränderungen der Kniebiomechanik, z.B. durch Meniskusresektion, degenerative Schädigungen im Gelenkknorpel hervorgerufen, die durch einen Verlust von Proteoglykanen zur Zerstörung des kollagenen Netzwerkes, vor allem von Kollagen Typ II, führen (117).

Neben Kollagenen (Typ I, II, III, IV, VI und XVIII) repräsentieren Proteoglykane, wie Chondroitin-6-Sulfat, Dermatan-Sulfate, Chondroitin-4-Sulfat, Keratin-Sulfat, Aggrecan, Biglycan und Decorin (6, 116) einen Hauptbestandteil der Extrazellulären Matrix. Proteoglykane spielen eine wesentliche Rolle in der Extrazellulären Matrix, die zusammengefasst für die Hydratisierung, Stabilität und Elastizität des Meniskusgewebes sorgen.

Durch die Recherche in der SwissProt Datenbank konnten neben Vorläuferpeptiden für Kollagen, Masse/Ladungsverhältnisse m/z 1287.6; 1501.7 und 1572.6 nachgewiesen werden. In der Datenbanksuche ergab sich ein Hinweis auf eine Proteoglycan 4 Vorstufe. Die AVG-Intensität (Tab.11) für die Masse/Ladungsquotienten 1287.6, 1501.7 und 1572.6 sind für die akuten Meniskusläsionen erniedrigt, im Gegensatz zu Proben von nicht akuten Meniskusläsionen.

Sowohl der Verlust von Kollagen als auch der Verlust von Proteoglykanen lässt vermuten, dass kollagen- und proteoglycanspaltende Enzyme eine wichtige Rolle in dem akuten degenerativen Prozess spielen. In Proben mit akut verändertem Meniskusgewebe wurden Masse/Ladungsverhältnisse m/z 1032.6 stark erhöht nachgewiesen. In der SwissProt Datensuche ergab sich hierfür ein Hinweis auf das Vorhandensein von Matrix-Metalloproteinase-1 (MMP-1). Verschiedene Matrix-Metalloproteinasen (MMP-1, MMP-3; MMP-9 und MMP-13) und Aggrecanase-1 und 2 sind verantwortlich für die Zerstörung von Kollagenstrukturen und Proteoglykanen in der Extrazellulär-Matrix von Knorpelgewebe. MMP-1 und MMP-13 gehören zu den Kollagenasen und führen zur Zerstörung von Kollagenfaserstruktur (118).

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit postulierte T. Mine et al (119), dass eine akute Meniskusläsion, zunächst zu einer Abnahme von Kollagen Typ II und III, gefolgt von Kollagen Typ I, vor allem in der Nekrosezone kommt. Laut T. Mine ist dies auf den Faserkonstruktionsverlust zurückzuführen.

Herweg et al konnten bereits 1983 in ihrer Studie einen Zusammenhang zwischen der Verringerung von Glycosaminoglykanen im Meniskusgewebe und dem Schweregrad der Meniskusdegeneration darstellen (35).

Die Masse/Ladungsverhältnisse m/z 1626.8 und 1607.8 wurden in den Gewebeproben mit akuter Meniskusschädigung als vermindert nachgewiesen. Die Datenbankrecherche gab hier den Hinweis auf das Vorliegen von reduziert exprimierten Fibronectin. Dieses Glykoprotein zählt neben Ancorin und Chondronectin zu den adhäsiven Glykoproteinen in der extrazellulären Matrix. Die Funktionsweise dieser Glykoproteine ähnelt einem „Zellkleber“ (120). Fibronectin enthält verschiedene Domänen, die Zelloberflächenrezeptoren für verschiedene Liganden darstellen, darunter Glycosaminoglykane und Kollagenen. In der Übersichtsarbeit von Houard et al (121) sowie verschiedenen aktuellen Studien, kommt es durch mechanischen Stress zur vermehrten Ausschüttung von MMP's und Zerstörung der extrazellulären Matrix durch Serineprotease. Es wird angenommen, dass Fragmente von Matrixproteinen auch mit Rezeptoren interagieren und somit die Matrixdestruktion vorantreiben können, indem sie zur Stimulierung von Cytokinen und MMP's beitragen (76, 77, 121)

Hierzu zählt Fibronectin, SLRP und Kollagen. Ein verminderter Fibronectinnachweis in Proben mit akuten Meniskusläsionen, im Vergleich zu chronisch degenerativ verändertem Gewebe, könnte dahingehend erklärt werden, dass bei akuten Läsionen eine Kaskade „noch“ nicht in Gang gesetzt wurde.

Die aktuellen Veröffentlichungen beziehen sich lediglich auf arthrotisch verändertes Knorpelgewebe. Da sowohl traumatische und degenerative Meniskusläsionen zu einem morphologischen Strukturumbau, zur veränderten Biomechanik und zur Kniegelenksarthrose führen (7, 60, 75), ist anzunehmen, dass auch hier ein ähnlicher Mechanismus vorliegt, der im geschädigten Meniskusgewebe zur Matrixdestruktion führt.

Die Frage, ob das MALDI-TOF Verfahren ein geeignetes Verfahren zur histologischen Meniskusdiagnostik darstellt, lässt sich folgendermaßen beantworten:

Unter Zuhilfenahme des von Krenn et al (58) vorgeschlagenen Degenerationsscore in normale, Low-grade und High-grade Meniskusdegeneration, konnte eine Übereinstimmung der histopathologischen Standarddiagnostik vs. MALDI-TOF Imaging Verfahren für High-grade vs. Low-grade Meniskusdegeneration gezeigt werden. Für die Gruppe der akuten vs. nicht akuten Meniskusläsionen kann keine eindeutige Aussage getroffen werden. Zwar wurde im Trainingsset mit einer Genauigkeit von 100% zwischen beiden Gruppen unterschieden, jedoch lässt eine kleine Probenanzahl keine eindeutige Aus-

sage zu. Es wird daher in Zukunft notwendig sein eine größere Anzahl (>100) an Gewebeproben pro Gruppe zu analysieren, um den wahren Nutzen der Methode in der histologischen Meniskusdiagnostik zu eruieren.

Eine untersucherunabhängige Objektivierung der histopathologischen Meniskusdiagnostik kann durch die MALDI-TOF Massenspektrometrie unter Einbeziehung adäquater klinischer Daten, wie personenbezogener Daten, Alter, Geschlecht, Gewicht, Gelenkfehlstellungen, Berufsanamnese, sportliche Aktivitäten sowie mithilfe histochemischer und immunhistochemischer Methoden erreicht werden.

5 Zusammenfassung

Die Meniskusdegeneration ist gekoppelt mit dem Verlust der mechanischen Tragfähigkeit des Knorpels. Dies ist ein wesentlicher Faktor für einen gerissenen Meniskus. Folgen dieser Meniskusgewebeänderungen sind Veränderungen der Biomechanik des Kniegelenks und die Entstehung der Arthrose. Die arthroskopische Meniskuspartialresektion stellt eine der häufigsten Therapieoptionen dar. Für die histopathologische Beurteilung der Gewebsfragmente stehen dem pathologischen Begutachter eine Vielzahl von Bewertungsscores zur Verfügung.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde MALDI-TOF Imaging als ein neues Verfahren zur objektiven Klassifikation von Meniskusläsionen vorgestellt. Die Massenspektrometrie ist eine Methode, bei der in paraffingebettetes Gewebe mit einer Matrix überschichtet wird, um eine „Flugfähigkeit“ von Ionen nach Laserapplikationen auf biologische Strukturen zu erzielen, um Proteine und Peptide im Gewebe zu detektieren. Zusätzlich ist auch eine Zuordnung morphologischer Strukturen möglich. In der vorliegenden Arbeit wurden 96 Gewebeproben von 68 Patienten untersucht. Es erfolgte die Erstellung von Klassifikationsmodellen mithilfe einer Support Vector Machine in Low-grade vs. High-grade Meniskusdegeneration und akuter vs. nicht akuter Meniskusläsionen. Hierbei sind die Masse/Ladungsverhältnisse von High-grade Meniskusdegeneration mit einer Genauigkeit von 88,8% im Trainingsset und 76,6% (170/222 Spektren) im Testset klassifizierbar. Bei den Low-grade Meniskusdegeneration sind diese im Trainingsset mit einer Genauigkeit von 100% und im Testset mit 85,5% (295/345 Spektren) bestimmbar. Bei der Klassifizierung von traumatischen (akuten) Meniskusläsionen erscheint eine weitere Testreihe mit einer größeren Probandengruppe sinnvoll. Neben klinischen Angaben und Vereinheitlichung des histopathologischen Bewertungsscores kann MALDI-TOF Imaging zur Befundobjektivierung beitragen und ist zukünftig als Erweiterung der histopathologischen Meniskusbegutachtung zu betrachten.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

- 1 Rabenberg, M. (2013). Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Arthrose(54) Robert Koch Institut. Berlin
- 2 Snoeker, B., Bakker, E., Kegel, C., Lucas, C. (2013). Risk factors for meniscal tears: a systematic review including metaanalysis. *J Orthop Sports Phys Ther*, 43 (6), 352-67.
- 3 AQUA GmbH, A. I. (2014). Arthroskopie am Kniegelenk (Vorbericht). Göttingen
- 4 Taeger, C. (2008). *Dissertationsschrift*. Tissue Engineering mit autologen Wachstumsfaktoren und Hyaluronsäure-Gelantine Kompositmatrices zur Reparatur avaskulärer Meniskusläsionen. Regensburg
- 5 Becker, R., & Fink, C. (2008). Epidemiologie und Konsequenz von Meniskusverletzungen. *Arthroskopie* (21), 221-222.
- 6 Krenn, V., Knöß, P., Rütger, W., Jakobs, M., Otto, M., Krukemeyer, M., et al. (2010). Meniskusdegenerationsscore und NITGE-Expression. *Orthopäde* (39), 475-485.
- 7 Pauli, C., Grogan, S., Patil, S., Otsuki, S., Hasegawa, A., Koziol, J., et al. (2011). Macroscopic and histopathologic analysis of human knee menisci in aging and osteoarthritis. *Osteoarthritis cartilage*, 19 (9), 1132-1141.
- 8 Longo, U., Loppini, M., Romeo, G., Maffulli, N., Denaro, V. (2012). Histological scoring systems for tissue-engineered, ex vivo and degenerative meniscus. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* (21), 1569-1576.
- 9 Pritzker, K., Gay, S., Jimenez, S. (2006). Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis cartilage*, 14 (1), 13-29.
- 10 Fisseler-Eckhoff, A. & Müller, K.-M. (2011). Histopathologische Begutachtung des Meniskus. *Pathologe* (32), 220-227.
- 11 Walch, A., Rauser, S., Deininger, S. O., Höfler, H. (2008). MALDI imaging mass spectrometry for direct tissue analysis a new frontier for molecular histology. *Histochem Cell Biol* (130), 421-434.

- 12 Kriegsmann, M. (2013). *Dissertationsschrift*, MALDI-MS-Imaging zur Untersuchung von synovialen Gewebe. Leipzig.
- 13 Kriegsmann, M., Seeley, E., Schwarting, A., Kriegsmann, J., Otto, M., Thabe, H., et al. (2012). MALDI-MS imaging as a powerful tool for investigating synovial tissue. *Scand J Rheumatol* (41), 305-309.
- 14 Casasonte, R. & Caprioli, R. (2011). Proteomic analysis of formalin-fixed paraffin embedded tissue by MALDI imaging mass spectrometry. *Nature protocols*, 6 (11), 1695-1709.
- 15 Kriegsmann, J., Casadonte, R., Zweynert, F., Kriegsmann, M., Otto, M., & Deininger, S. (2013). MALDI-TOF-Bildgebung. *Z Rheumatol* (72), 724-728.
- 16 Rauser, S., Höfler, H., Walch, A. (2009). In-situ-Proteomanalyse von Gewebe-Mittels bildgebender Massenspektrometrie. *Pathologe* (30), 140-145.
- 17 Chivers, M., & Howitt, S. (2009). Anatomy and physical examination of the knee menisci: a narrative review of the orthopedic literature. *J Can Chiror Assoc* 53 (4), 319-333.
- 18 Schiebler, T., Schmidt, W., Zilles, K. (1995). *Anatomie* (Auflage 7). (K. Zilles, Hrsg.) Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. S.336
- 19 Clark, C., & Ogden, J. (1983). Development of the menisci of the human knee joint. *J Bone Joint Surg* (65A), 538-47.
- 20 Brindle, T., Nyland, J., & Johnson, D. (2001). The Meniscus: Review of Basic Principles With Application to Surgery and Rehabilitation. *Journal of Athletic Training*, 36 (2), 160-169.
- 21 McDermott, I. (2006). Meniscal tears. *Current Orthopaedics*. (20), 85-94.
- 22 Messner, K., & Gao, J. (1998). The menisci of the knee joint. Anatomical and functional characteristics and a rationale for clinical treatment. *J Anat* (193), 161-178.
- 23 Aagaard, H., & Verdonk, R. (1999). Function of the normal meniscus and consequences of meniscal resection. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, 9 (3), 134-140.

- 24 Kaplan, E. (1956). The embryology of the menisci of the knee joint. *Bull Hosp Joint Dis* (17), 176-81.
- 25 Choi, Y., Kim, J., Chung, J., Lee, D., Ryu, K., Ha, D., et al. (2014). The association between meniscal subluxation and cartilage degeneration. *Eur J Orthop Surg Traumatol* (24), 79-84.
- 26 Arnoczky, S. P. (1992). Gross and Vascular Anatomy of the Meniscus and its role in meniscal healing, regeneration, and remodeling. In: *Knee Meniscus: Basic and Clinical Foundations*, Mow, VC., Arnoczky, SP., Jackson, DW., Raven Press, New York, 1-14
- 27 McDermott, I., Sharifi, F., Bull, A. (2004). An anatomical study of meniscal allograft sizing. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* (12), 130-135.
- 28 Stärke, C. (2008). Form und Funktion von Menisken. *Arthroskopie* (21), 223-228
- 29 Rupp, S., Seil, R., Kohn, D. (2002). Meniscus lesions. *Der Orthopäde* (31), 812-28.
- 30 Fink, C. (2001). Meniskusrefixation und Anatomische Grundlagen. *Arthroskopie* (14), 248-253.
- 31 Kohn, D., & Moreno, B. (1995). Meniscus insertion anatomy as a basis for meniscus replacement: a morphological cadaveric study. *Arthroscopy* (11), 96-103.
- 32 Fu, F., & Thompson, W. (1992). Motion of the meniscus during knee flexion. In: *Knee Meniscus: Basic and Clinical foundations*: Mow, VC., Arnoczky, SP., Jackson, DW., Raven Press, New York, 75-90
- 33 Bullough, P., Munuera, L., Murphy, J., Weinstein, A. (1970). The strength of the menisci of the knee as it relates to their fine structure. *J Bone Joint Surg Br* (52), 564-567.
- 34 Peters, G. & Gosse, F. (1998). Diskoider Meniskus beim Kind. *Arthroskopie* (11), 22-27.
- 35 Herweg, J., Egner, E., Buddecke, E. (1984). Chemical changes of the human knee joint menisci in various stages of degeneration. *Annals of the rheumatic diseases* 43 (4), 635-640.

- 36 Mow, V., Ratcliff, A., Chern, K., Kelly, M. (1992). Structure and function relationships of the menisci of the knee. In: Knee meniscus: Basic and Clinical foundations. Mow, VC, Arnoczky, SP, Jackson, DW., Raven Press, New York, 37-57
- 37 Arnoczky, S., & Warren, R. (1982). Microvasculature of the human meniscus. *Am J SportsMed* 10 (2), 90-95.
- 38 Schunke, M., Schulte, E., Schumacher, U., Voll, M., Wesker, K.(2014) Prometheus Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem: Lernatlas der Anatomie. Thieme Verlag, 4. Auflage
- 39 Freeman, M., & Wyke, B. (1967). The innervation of the knee joint. An anatomical and histological study in the cat. *J.Anat*, 101 (3), 505-532.
- 40 Müller, W. (1982). Das Knie- Form, Funktion und ligamentäre Wiederherstellungschirurgie (Bd. 1). Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, New York
- 41 Zimny, M., Albright, D., Dabezies, D. (1988) Mechanoreceptors in the human medial meniscus. *Acta Anat* (133), 35-40.
- 42 Mine, T., Kimura, M., Sakka, A., Kawai, S. (2000). Innervation of nociceptors in the menisci of the knee joint: an immunohistochemical study. *Arch Orthop Trauma Surg* (120), 201-204.
- 43 Ahmed, A. (1992). The load-bearing role of the knee menisci. In: Knee meniscus: basic and Clinical foundations. Mow, VC., Arnoczky, SP, Jackson, DW., Raven Press, New York, 59-73
- 44 Chen, M., Branch, T., Hutton, W. (1996). Is it important to secure the horns during lateral meniscal transplantation? A cadaveric study. *Arthroscopy* (12), 174-181.
- 45 Adams, M., & Hukins, D. (1992). The Extracellular Matrix of the Meniscus. In: Knee Meniscus: Basic and Clinical Foundations: Mow, VC., Arnoczky, SP., Jackson, DW. Raven Press, New York, 15-28
- 46 Boya, H., Pmar, H., Gülay, Z., Oktay, G., Özer, E. (2004). Clinical and arthroscopic features of meniscal tears and a search for the role of infection in histologically confirmed meniscal mucoid degeneration. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* (12), 294-299.

-
- 47 Bernstein, J. (2010). In Brief: Meniscal Tears. *Clin Orthop Relat Res*, 1190-1192.
- 48 Becker, R. (2002). *Habilitationsschrift*. Meniskusverletzungen: Untersuchung zur Meniskusnaht und Meniskusheilung. Magdeburg
- 49 Baker, B., Peckham, A., Pupparo, F., Sanborn, J. (1985). Review of meniscal injury and associated sports. *Am J Sports Med* (13)1-4.
- 50 Anagnostakos, K., Bachelier, F., Kohn, D. (2006). Meniskuserkrankungen. *Orthopädie und Unfallchirurgie up2date* (5), 477-494.
- 51 McGlynn, F., Caspari, R., Whipple, T., Meyers, J., Hutton, P. (1986). The Role of Arthroscopy in the Treatment of Tibial Plateau Fractures. *Iowa Orthop J* (6), 107-113.
- 52 Grifka, J., & Richter, J. (1992). Meniskussonographie, Lehrbuch und Atlas; Bücherei des Orthopäden. (J. K.-F. Schlegel, Hrsg.) Ferdinand Enke Verlag. Stuttgart.
- 53 Skinner, S. (2012). MRI of the knee. *Aust Fam Physician* (41), 867-9.
- 54 Maffuli, N., Longo, U., Campi, S., Denaro, V. (2010). Meniscal tears. *Open Access Journal of Sports Medicine*, 45-54.
- 55 Metcalf, R., Burks, R., McGinty, J. (1996). Arthroscopic meniscectomy. In: *Operativ Arthroscopy*, McGinty, J., Caspari, R., Jackson, R., Poehling, G. Lippincott-Raven. New York, 263-297
- 56 Jee, W., McCauley, T., Kim, J., Jun, D., Lee, Y., Choi, B., et al. (2003). Meniscal tear configurations: categorization with MR imaging. *AJR Am Roentgenol* (180), 93-97.
- 57 Netter, F. (1993). The CIBA -Collection of Medical Illustrations-Musculoskeletal System Volume 8 Part III Trauma, Evaluation, and Management (Bd. 8). CIBA-GEIGY Corporation, New York
- 58 Krenn, V., Kurz, B., Krukemeyer, M., Knoess, P., Jakobs, M., Poremba, C., et al. Histopathologischer Degenerations-Score des Faserknorpels. *Z Rheumatol* (69), 644-652.

-
- 59 Krenn, V., Berger, I. Kriegsmann, J. (2008). Rheuma/Gelenkpathologie/Infektionsdiagnostik. (43-44), 169. *IAP-Lehrserie*, Bonn
- 60 Fisseler-Eckhoff, A. & Müller, K.-M. (2009). Histopathologische Meniskusdiagnostik. *Orthopäde* (38), 539-545.
- 61 Müller, K.-M., Fisseler-Eckhoff, A. , Kuhn, C. (2005) Pathologie der Knieregion unter Berücksichtigung versicherungsmedizinischer Aspekte, *IAP-Lehrserie* 63
- 62 Griffiths, J. (2008). A Brief History of Mass Spectrometry. *Anal. Chem*, 5678-5683.
- 63 Biemann, K. (1995). The coming of age of mass spectrometry in peptide and protein chemistry. *Protein Science* (4), 1920-1927.
- 64 Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T. (1988). Protein and polymer analysis up to m/z 100.000 by laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* (2), 151-153.
- 65 Karas, M., & Hillenkamp, F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* (60), 2299-301.
- 66 Marvin, L. F., Roberts, M. A., Fay, L. B. (2003). Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta* (337), 11-21.
- 67 Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., Whitehouse, C. M. (1989). Electrospray ionization for mass-spectrometry of large biomolecules. *Science* (246), 64-71.
- 68 Aebersold, R., & Goodlett, D. R. (2001). Mass spectrometry in proteomics. *Chem Rev* (101), 269-295.
- 69 Godovac-Zimmermann, J., & Brown, L. (2001). Perspectives for mass spectrometry and functional proteomics. *Mass Spectrom Rev* (20), 1-57.
- 70 Seely, E., Schwamborn, K., Caprioli, R. (2008). Imaging of intact tissue sections: moving beyond the microscope. *J Biol Chem*.
- 71 Mulisch, M.; Welsch, U. (2010) Romeis Mikroskopische Technik, Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg, Berlin. 181-297

- 72 J. Petzold, Rita Casadonte, M. Otto, M. Kriegsmann, M. Granrath, A. Baltzer, J. Vogel, P. Drees, S. Deininger, M. Becker, J. Kriegsmann (2014), *MALDI-Massenspektrometrie am Meniskus-Objektivierung morphologischer Befunde*, *Z Rheumatol* 2014, 1-9
- 73 Salzer, M., Lin, A., Miller, C., Herold, S., Irrgang, J., Harner, C. (2014). Complications after arthroscopic knee surgery. *Am J Sports Med* (42) (2), 292-296.
- 74 Bundesamt, für Statistik. (2012). Fallpauschal bezogene Krankenhausstatistik (DRG-Statistik), Diagnosen, Fallpauschalen und Case Mix der vollstationären Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern 2012. (12 . *Statistisches Bundesamt*. Wiesbaden
- 75 Hunter, D. (2012). Degeneration of the meniscus and progression of osteoarthritis. *HSS journal: The musculoskeletal journal of Hospital for Special Surgery* 8 (1):1 3-4.
- 76 Homandberg, G., Wen, C., Hui, F. (1998). Cartilage damaging activities of Fibronectin fragments derived from cartilage and synovial fluid. *Osteoarthritis cartilage* 6 (4), 231-244.
- 77 Bank, R., Krikken, M., Beekman, B. (1997). A simplified measurement of degraded collagen in tissues: application in healthy, fibrillated and osteoarthritis cartilage. *Matrix Biol* 16 (5), 233-243.
- 78 Fairbank, T. (1948). Knee joint changes after meniscectomy. *J Bone Joint Surg Am* (30), 664-670.
- 79 Wenzl, M., & Fuchs, S. (2001). Berufsbedingte Erkrankungen des Meniskus. *Trauma Berufskrankh* (3), 138-142.
- 80 Ockert, B., Haasters, F., Polzer, H., Kessler M. A., Mutschler, W., Kanz K. G. (2010). Der Verletzte Meniskus: Wie sicher ist die klinische Untersuchung? Eine Metaanalyse. *Unfallchirurg* (113), 293-299
- 81 Harris, I., Madan, N., Naylor, J., Chong, S., Mittal, R., Jalaludin, B. (2013). Trends in knee arthroscopy and subsequent arthroplasty in an Australian population: a retrospectiv cohort study. *BMC Musculoskelet Disord* ,14: 143.
- 82 Treutling, R. (2000). Minimally Orthopedic Surgery: *Arthroscopy* (3), 2, 158-163.

-
- 83 Landis, J. & Koch, G. (1977). The measurement of observer agreement of categorical data. *Biometrics* (33), 159-174.
- 84 Gwet, K. L. (2008). Inter-Rater Reliability. Wiley Encyclopedia of Clinical Trials. John Wiley and Sons. New Jersey
- 85 Hempfling, H., Krenn, V., Weise, K. (2014). Histopathologische Befunde: Einheitliche Bezeichnungen in medizinischen Gutachten gefordert. *Deutsches Ärzteblatt* (50), 2224-2225.
- 86 Klimstra, D., Modlin, I., Coppola, D., Lloyd, R., Suster, S. (2010). The Pathologic Classification of Neuroendocrine Tumors: A Review of Nomenclature, Grading and Staging Systems. *Pancreas* (39), 707-712.
- 87 Hauptmann, S., du Bois, S., Meinhold-Herlein, I., Pfister, J., Avril, S. (2014). Histologische Malignitätsgraduierung des Ovarialkarzinoms: Überblick und Empfehlung. *Pathologe* (35), 497-503.
- 88 Oellig, W., & Rüther, M. (1981). Zur Morphologie und Beurteilung der Rissbeschädigung am Kniegelenksmeniskus. *Unfallheilkunde* (84), 295-301.
- 89 Seitz, M., Zaak, D., Knüchel-Clarke, R., Stief, C. (2005). Harnblasentumore: Die neue WHO-Klassifikation 2004. *Urologe* (44), 1073-1086.
- 90 Müller, K. (1988). Meniskusverletzung-Pathologisch-anatomischer Befund. In Hierholzer G, Ludolph E, Hamacher E (Hrsg): Gutachterkolloquium 3. Springer Verlag Heidelberg, Berlin, 113-124
- 91 Cassagne, C., Ranque, S., Normand, A.-C., Fourquet, P., Thiebault, S., Planard, C., et al. (2011). Mould Routine Identification in the Clinical Laboratory by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. 6 (12). (PLOS, Hrsg.) www.plosone.org.
- 92 Schwamborn, K., & Caprioli, R. (2012). Molecular imaging by mass spectrometry-looking beyond classical histology. *Nature reviews*, 639-646.
- 93 Chaurand, P., Schwartz, S., Reyzer, M., Caprioli, R. (2005). Imaging Mass Spectrometry: Principles and Potentials. (S. o. Pathology, Hrsg.) *Toxicologic Pathology* (33), 92-101.

-
- 94 Stoeckli, M., Chaurand, P., Halahan, D., Caprioli, R. (2001). Nature publishing group. Von [http:// medicine-nature.com](http://medicine-nature.com)
- 95 Christianini, N., & Shawe-Taylor, J. (1999). An introduction to support vector machines: and other kernel-based learning methods. Cambridge University Press, New York
- 96 Rouslan Moro, Laura Auria. (2008). Support Vector Machines (SVM) as a technique for solvency analysis. *Discussion Paper*, DIW, Berlin
- 97 T. Eitrich. (2003) Support-Vektor-Maschinen und ihre Anwendung auf Datensätze aus der Forschung. Berichte des Forschungszentrums Jülich , Forschungszentrum Jülich
- 98 Vapnik, V. (1998). Statistical Learning Theory, Wiley and Sons, New York
- 99 Graf, R. J. (2011). *Masterarbeit*. Objektklassifizierung mit Support Vector Machines. Zentrum für GeoInformatik der Universität Salzburg. Salzburg.
- 100 Graf, R., & Wegenkittl, S. (2012). Integration von Support Vector Machines in die objektbasierte Bildklassifizierung am Beispiel der Entwicklung eines Plug-Ins für eCognition. In S. J. & G. G. Blaschke T, Angewandte Geoinformatik (S. 51-61). Herbert Wichman Verlag, Berlin Offenbach
- 101 Duda, R., & Hart, P. (1973). Pattern classification and scene analysis. Wiley and Sons, New York.
- 102 Howard, R., Carniquiri, A., & Beavis, W. (2014). Parametric and nonparametric statistical methods for genomic selection of traits with additive and epistatic genetic architectures. *G3 Genes/Genomes/Genetics* , 6 (4), 1027-1046.
- 103 Hastie, T., Tibshirani, R., Friedman, J. (2002). The Elements of Statistical Learning. Springer Science Business. New York.
- 104 Agner, S., Rosen, M., Englander, S., Tomaszewski, J., Feldmann, M., Zhang, P., et al. (2014). Computerized Image Analysis for Identifying Triple-Negative Breast cancers and differentiating them from other molecular subtypes of Breast Cancer on dynamic contrast-enhanced MR Images: A Feasibility Study. *Radiology*, 272 (1), 91-9.

-
- 105 Veronese, E., Castellani, U., Peruzzo, D., Bellani, M., Brambilla, P. (2013). Machine learning approaches: from theory to application in Schizophrenia. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, Volume 2013 (2013), Article ID 867924, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/867924>
- 106 Abe, S. (2002). *Support Vector Machines for Pattern Classification*. Springer Verlag London.
- 107 Vidyasagar, M. (2014). Machine learning methods in the computational biology of cancer. *rspa.royalsocietypublishing.org*: <http://dx.doi.org/10.1098/rspa.2014.0081>
- 108 Heikamp, V., & Bajorath, J. (2014). Support Vector Machines for drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*, 9 (1), 93-104.
- 109 McNicholas, M., Rowley, D., McGurty, D. e. (2000). Total meniscotomy in adolescence. A thirty-year follow up. *J Bone Joint Surg* (82(2)), 217-221.
- 110 Higuchi, H., Kimura, M., Shirakura, K. e. (2000). Factors affecting long-term results after arthroscopic partial meniscectomy in an otherwise normal knee. *Clin Orthop* (377), 161-168.
- 111 Fleischmajer, R., MacDonald, E., Perlish, J., Burgeson, R., Fisher, L. (1990). Dermal collagen fibrils are hybrids of type I and III collagen molecules. *J Struct Biol* (105), 162-169.
- 112 Athanasiou, K., & Adams-Sanchez, J. (2009). Engineering the Knee Meniscus. In: *Synthesis lectures on Tissue Engineering*, Vol 1, S. 1-97. Morgan & Claypool Publishers, San Rafeael, USA
- 113 Cheung, H. (1987). Distribution of Type I, II, III and V pepsin solubilized collagens in bovine meniscus. *Connective Tiss Res* (16), 343-356.
- 114 Fox, Alice J.S., Bedi, Asheeh, Rodeo Scott A (2012). The Basic Science of Human Knee Menisci-Structure, Composition and Function, *Sports Health* 4 (4), 340-351
- 115 Güzel, G. (2009). *Dissertationsschrift*. Expressionsanalyse humaner Fibrochondrozyten in Zellkultur. Tübingen

-
- 116 Eleftherios, A., Makris, M., Pasha Hadidi, B., Kyriacos, A. (2011). The knee meniscus: structure-function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration. *Biomaterials* 32(30), 7411-7431.
- 117 Appleton, C, Pitelka, V., Henry, J., Beier, F. (2007). Global analysis of gene expression in early experimental osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 56 (6), 1854-1868.
- 118 Zielinska, B., Killian, M., Kadmiel, M., Nelson, M., Haut Donahue, T. (2009) Meniscal tissue explants response depends on level of dynamic compressive strain. *Osteoarthritis and Cartilage*, 17 (6), 754-760.
- 119 Mine, T., Ihara, K., Kawamura, H., Date, R., Umehara, K. (2013). Collagen expression in various degenerative meniscal changes: an immunohistological study. *Journal of Orthopedic Surgery*.21 (2), 216-20.
- 120 Kalniev, M., Krastev, D., Krastev, N. (2013). Investigation about the distribution of Fibronectin in the central zone of the knee joint menisci. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences*. 66(11): 1653-1656
- 121 Houard, X., Goldring, M. B., Berenbaum, F. (2013). Homeostatic mechanisms in articular cartilage and role of inflammation in osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep*.15(11):375
- 122 Hardesty WM, Caprioli RM.(2008), In situ molecular imaging of proteins in tissues using mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 391(3):899-903

7 Anhang

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

.....

Unterschrift

Danksagung

Großer Dank gebührt **PD Dr. med. Axel Baltzer und Prof. Dr. med. Dr. phil. Jörg Kriegsmann** für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie für die Unterstützung und hilfreichen Ratschläge bei der Erstellung der Arbeit.

Des Weiteren möchte ich **Dr. Markus Granrath** für die Hilfe bei der Probengewinnung danken.

Mein besonderer Dank gilt **Dr. Rita Casadonte** für die Hilfestellung und Beantwortung meiner Fragen, das MALDI-TOF Verfahren betreffend.

Frau M. Wöller möchte ich für die Koordination und Organisation des Probentransportes danken.

Abschließend bedanke ich mich bei **Dr. med. Michael Kodsí, Frau Dr.med. Ursula Onder** und **Herrn Christian Kaiser** für die Korrekturarbeiten und Hilfe beim Layout.