

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

**Beurteilung von altersbedingten Knorpelveränderungen an
Hüftgelenken durch molekulare MRT-Bildgebung (*dGEMRIC*) und
histologische Validierung der Methode am Schafsmodell in zwei
Altersgruppen**

Dissertation

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

vorgelegt von

Clemens Justus Crumbiegel

2019

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöckner

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Christoph Zilkens

Zweitgutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Christoph Schleich

Auflistung der Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Zilkens C, Miese F, Crumbiegel C, Kim YJ, Herten M, Antoch G, Krauspe R, Bittersohl B. **Magnetic resonance imaging and histology of ovine hip joint cartilage in two age populations: a sheep model with assumed healthy cartilage.** *Skeletal Radiology*. 2013;42(5):699-705. Published online: *Skeletal Radiology*; 2012: DOI 10.1007/s00256-012-1554-7

Zusammenfassung

Fragestellung: Das MRT-Verfahren *dGEMRIC* (*delayed Gadolinium Enhanced MRI of Cartilage*) ermöglicht eine Beurteilung von Veränderungen der Knorpelzusammensetzung, zum Beispiel einer Verminderung und Degradation von Glykosaminoglykanen (GAG) im Rahmen degenerativer Knorpelerkrankungen. In Vorstudien konnten auch bei knorpelgesunden Probanden Varianzen in den gemessenen T1_{Gd}-Zeiten erfasst werden. Somit war die zu Grunde liegende Arbeitshypothese der vorliegenden Studie, dass bei den Versuchsgruppen selbst in morphologisch intaktem Gelenkknorpel biochemische Unterschiede zu detektieren sind und dass das *dGEMRIC*-Verfahren in der Lage ist, diese Varianzen darzustellen. Es wurde aufgrund der Verfügbarkeit größerer altersgleicher Versuchsgruppen das Schaf als bereits etabliertes Arthrosemodell für die histologische Beurteilung des Gelenkknorpels herangezogen.

Methoden: Es wurden jeweils 10 Knorpelproben von Hüftköpfen gesunder Schafe aus zwei Altersgruppen (< 6 Monate; 2,5 bis 3 Jahre) entnommen; diese wurden markiert und mittels des *dGEMRIC*-Verfahrens sowie orientierender *DESS*-Sequenzen im MRT untersucht. Im Anschluss erfolgte eine Schnittbildanfertigung mittels der Trenn-Dünnschliff-Technik sowie die histologische Untersuchung durch Kollagen-*ELISA* und Toluidinblaufärbung. Durch zwei unabhängige Beobachter wurden die *Regions of Interest* (*ROIs*) in den MRT-Sequenzen durch eine 3D-Reformatierung den histologischen Schnittbildern zugeordnet und die entsprechenden T1_{Gd}-Zeiten mit den Resultaten der Färbung, quantifiziert nach dem Mankin-Score, abgeglichen.

Ergebnisse: Es konnten 303 *ROIs* untersucht werden, von denen 26 wegen zu hochgradiger Knorpelschädigung oder schlechter Bildqualität im MRT-Bild ausgeschlossen werden mussten. Insgesamt konnten somit 277 *ROIs* ausgewertet werden. Die Population der Lämmer zeigte weitestgehend intakte GAG, wobei 34 % der untersuchten *ROIs* einen Score von 0 und 66 % eine Score von 1 aufwiesen. Nur bei 2 % der Untersuchungen fanden sich Defizite in der Anfärbbarkeit. In 16 % der untersuchten *ROIs* bei den älteren Schafen hingegen zeigten sich Scores von 2 oder mehr. In 23 % der Untersuchungen der Versuchsgruppe Schaf fand sich eine Verminderung der Anfärbbarkeit durch Toluidinblau. Es zeigte sich, dass die T1_{Gd}-Zeiten in der Gruppe der Lämmer im Vergleich zu denen in der Gruppe der Schafe signifikant höher waren (623,6 ms ± 72,8 ms gegenüber 540,4 ms ± 92,9 ms). Der p-Wert lag bei < 0,001. Die Kollagenfärbungen wurden aufgrund von Färbefehlern nicht ausgewertet.

Diskussion: Grundlegend konnte mittels der verringerten T1_{Gd}-Zeiten sowie der Mankin-Scores eine Verringerung des GAG-Gehaltes in der älteren Versuchsgruppe gegenüber der Versuchsgruppe der Lämmer erkannt werden. Da makroskopisch geschädigte Knorpelpräparate keinen Eingang in die Auswertung fanden, ist von einer alters- oder belastungsabhängigen Degradation des Knorpelgewebes auszugehen. Das *dGEMRIC*-Verfahren zeigte sich als valides Diagnostikum zur Detektion dieser Veränderungen. Die T1_{Gd}-Zeiten glichen denen aus früheren Studien mit menschlichen Probanden. Das Schafsmodell konnte somit als sinnvolles Modell für Forschungen zur GAG-Quantifizierung herausgestellt werden. Weitere Studien zur Beurteilung von Frühveränderungen der GAG und Kollagene sind notwendig.

Abstract

Objective: The *delayed Gadolinium Enhanced Magnetic Resonance Imaging of Cartilage* (dGEMRIC) technique allows evaluation of early changes of joint cartilage like degradation of glycosaminoglycans (GAG) in case of degenerative diseases of cartilage. In previous publications significant variations in T1_{Gd}-values within control groups with morphologically normal appearing cartilage could be noticed. Thus, the purpose of this study was to compare the cartilage status in two age groups without underlying prearthritic hip joint deformities by performing high resolution MRI (dGEMRIC) and to reveal differences in content of GAG. Therefore, a sheep study was conducted, as sheep are an established Osteoarthritis (OA) model and different age groups of the same race are readily available for cartilage assessment, including histological validation.

Materials and methods: Twenty femoral head specimen collected from ten lambs (aged < 6 months) and ten young adult sheep (aged between 2,5 and 3 years) were marked with a surgical suture and underwent dGEMRIC and morphological cartilage assessment by a Double-Echo Steady-State sequence (DESS). Slices were formed by the sawing and grinding technique. Histological analysis was performed by Collagen-ELISA and staining with conventional toluidine blue according to the Mankin scoring system. Two independent viewers matched all regions of interest (ROIs) examined by MRI with histological sections and compared T1_{Gd}-values with corresponding Mankin-scores.

Results: A total of 303 regions of interest were assessed (101 slices with 3 ROIs each). Twenty-six ROIs were excluded due to cartilage damage or insufficient MR image quality. Therefore a total of 277 ROIs were analyzed. Histological analyses revealed nearly intact GAG in samples of Group I (lambs) with 34% of ROIs scored 0 and 66% scored 1. Loss of staining intensity was found in 2% of examinations only. Distinct degenerative changes in cartilage samples of group II (young adult sheep) were found, reflected by total Mankin scores of 2 in 16% and loss of toluidine staining intensity in 23% of examinations. T1_{Gd}-values in group I (mean T1-Gd: 623,6 ms ± 72,8 ms) were significantly ($p < 0,001$) higher compared with group II (mean T1-Gd: 540,4 ms ± 92,9 ms). All results of Collagen-ELISA were not accounted due to a loss of reliable staining results.

Discussion: Although morphologically normal, distinct cartilage degeneration present in young adult sheep could be identified via decreased T1_{Gd}- values. The dGEMRIC technique revealed these changes and may be a tool for the assessment of early cartilage degeneration. T1_{Gd}- values were similar to results of human cartilage examined in previous studies. The Sheep model seemed to be useful as a model for cartilage assessment in OA. Further controlled studies including healthy human cartilage samples are required to confirm our preliminary results.

Abkürzungsverzeichnis

CT	Computer-Tomografie
WHO	<i>World Health Organization</i>
a.p.	anterior posterior
ECF	Epiphyseolysis capitis femoris
MRT	Magnetresonanz-Tomografie
FLASH	<i>Fast-Low-Angle-Shot</i>
SPGR	<i>Spoiled Gradient Recalled</i>
dGEMRIC	<i>delayed Gadolinium Enhanced Magnetic Resonance Imaging of Cartilage</i>
GAG	Glykosaminoglykane
ACT	autologe Chondrozytentransplantation
Gd-DTPA²⁻	<i>Gadolinium Diethylene Triamine Pentaacetic Acid</i>
ROI	<i>Region of Interest</i>
DESS	<i>Double Echo Steady State</i>
TR	Repetitionszeit
TE	Echozeit
BW	Bandbreite
FOV	<i>Field of View</i>
TA	Akquisitionszeit
NEX	<i>Number of Excitations</i>
VIBE	<i>Volumetric Interpolated Breathhold Examination</i>
MPR	<i>Multiplanar-Reformatting-Programme</i>
PMMA	Polymethylmethacrylat
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
AEC	<i>3-amino-9-ethylcarbazole</i>
CCD	<i>Charge-coupled Device</i>
FAI	Femoroazetabuläres Impingement

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Degenerative Gelenkerkrankungen.....	1
1.1.1 Einführung Arthrose.....	1
1.1.2 Ätiologie.....	2
1.1.3 Epidemiologie.....	3
1.1.4 Pathogenese.....	3
1.1.5 Klinik.....	5
1.1.6 Diagnostik.....	6
1.1.6.1 Aktuelle Möglichkeiten der klinischen Diagnostik.....	6
1.1.6.2 Röntgenradiologische Diagnostik.....	6
1.1.6.3 Arthroskopie.....	8
1.1.6.4 MRT-Bildgebung.....	8
1.1.7 Therapie.....	10
1.1.7.1 Konservative Therapieansätze.....	10
1.1.7.2 Operative Therapieansätze.....	11
1.2 delayed Gadolinium-Enhanced Magnetic Resonance Imaging of.....	
Cartilage (<i>dGEMRIC</i>).....	12
1.3 Studienziel.....	15
1.4 Das Schaf als Tiermodell.....	16
2. Material und Methoden	18
2.1 Akquisition der Versuchstiere.....	19
2.2 Gewinnung der Präparate und Markierung.....	19
2.3 MRT-Bildgebung (<i>dGEMRIC</i> Analyse und Beurteilung der Morphologie).....	22
2.4 Statistische Auswertung.....	27
2.5 Präparation zur histologischen Begutachtung.....	28
2.5.1 Aufbereitung.....	28
2.5.2 Einbettung.....	29
2.6 Histologische Analyse.....	30
2.6.1 Entplasten der Präparate.....	31
2.6.2 Immunhistologie.....	31
2.6.3 Auswertung der Immunhistologie.....	32

2.6.4 Entfärbung.....	33
2.6.5 Toluidinblaufärbung.....	33
2.6.6 Auswertung mittels <i>Mankin-Score</i>	35
3. Ergebnisse	38
3.1 Erklärung.....	38
3.2 Auswertungen der Histologie mittels Toluidinblaufärbung.....	38
3.3 Auswertungen der T1 _{Gd} -Zeiten.....	42
3.4 Auswertungen der Histologie mittels immunhistologischer Färbung.....	43
4. Diskussion	45
4.1 Allgemeines.....	45
4.2 Die Wahl des Tiermodels.....	48
4.3 Ergebnisse der T1 _{Gd} -Zeiten.....	49
4.4 Einflussfaktoren.....	50
5. Zusammenfassung	51
6. Literaturverzeichnis	53
7. Appendix	63
7.1 Abbildungsverzeichnis.....	63
7.2 Tabellen.....	65

1. Einleitung

1.1 Degenerative Gelenkerkrankungen

Bei degenerativen Gelenkerkrankungen handelt es sich um belastungsabhängige und progrediente Schädigungen von Gelenkstrukturen, welche häufig mit Funktions- einbußen oder einer Einschränkung der Lebensqualität einhergehen. Zum entsprechenden Formenkreis wird heutzutage hauptsächlich die Gelenkarthrose gezählt. Jedoch sind auch Pathologien, die mit Veränderungen von anderen Weichteilstrukturen vergesellschaftet sind, zum Beispiel belastungsinduzierte Bandscheibendegenerationen oder chronische Meniskusschäden unter dem Begriff der degenerativen Gelenkerkrankungen zu subsumieren.

1.1.1 Einführung Arthrose

Der Begriff der Arthrose beschreibt eine chronisch fortschreitende degenerative und primär nicht entzündliche Erkrankung besonders belasteter Gelenke wie zum Beispiel des Schulter- oder Hüftgelenkes. Sekundär geht diese mit progredienten Weichteil- und Knochenschädigungen einher, im Spätstadium folgen Gelenksdestruktionen und Fehlstellungen. Synonyme sind: Arthrosis deformans, Osteoarthrose oder degenerative Arthropathie. Im angloamerikanischen Sprachgebrauch finden sich die Bezeichnungen Osteoarthritis oder degenerative Arthritis.

Die Erkrankung kann auf dem Boden einer bereits bestehenden und diagnostizierten Pathologie auffällig werden (sekundäre Arthrose) oder sporadisch, beziehungsweise ohne den konkreten Nachweis einer Ursache entstehen (primäre Arthrose). Laut Studien ist die Inzidenz der Erkrankung mit zunehmendem Alter weiterhin steigend [1, 2], insgesamt sind vor allem ab dem 55. Lebensjahr anteilig mehr Frauen betroffen [2]. Pathogenetisch steht zumeist eine belastungsbedingte Degradation der chondralen Substanz im Mittelpunkt [3]. Der Verlust der im Knorpel enthaltenen Glykoproteinverbindungen bewirkt eine qualitative und quantitative Verminderung der Knorpelsubstanz. Durch konsekutive knöcherne Umbauprozesse und eine zunehmende Entzündungsreaktion kommt es zu einer verminderten Bewegungsfähigkeit im Gelenk. Schlimmstenfalls ist mit einem Funktionsverlust zu rechnen.

Zu den diagnostischen Möglichkeiten zählen neben der klinischen Untersuchung die Bildgebung mittels Röntgen oder CT, die Sonografie [4], die diagnostische Arthroskopie sowie in zunehmendem Maße auch kernspintomografische Verfahren [5]. Therapeutisch stehen konservative Maßnahmen in Form von Physiotherapie und Schmerzmedikation im Vordergrund, bei frühzeitiger Diagnosestellung kommen knorpelregenerierende Verfahren wie die autologe Chondrozyten-Transplantation (ACT) oder operative Verfahren wie Umstellungsosteotomien und die Pridiebohrung bei Arthroskopen in Frage. In letzter Instanz steht der operative Gelenkersatz mittels Endoprothetik im Fokus.

1.1.2 Ätiologie

Ausgangspunkt der Erkrankung ist eine durch Veränderungen auf molekularer Ebene bedingte Verminderung der Qualität des Gelenkknorpels. Hierbei kommt es meist zu einem Missverhältnis zwischen Belastungsfähigkeit und einem erhöhten pathologischen Belastungsanspruch [3]. Zu unterscheiden sind zwei Formen der Arthrose: Ist die unmittelbare Ursache der chondralen Degression unklar, so wird von der primären Arthrose gesprochen. Als sekundäre Form wiederum werden Arthrosen bezeichnet, welche auf der Basis einer bestehenden und bereits langfristig das Gelenk beanspruchenden Pathologie entstehen. Hauptursächlich hierbei sind Achsenabweichungen und Instabilitäten. Am Beispiel der Koxarthrose ist davon auszugehen, dass der größte Teil der Erkrankungen (bis zu 90 %) auf derartige Veränderungen zurückzuführen ist [6]. Somit zählen sowohl angeborene Dysplasien als auch erworbene Gelenkstörungen wie der Morbus Perthes und die Epiphyseolysis capitis femoris (ECF) zu den häufigsten Ursachen der sekundären Koxarthrose [7]. Als weitere begünstigende Faktoren sind rheumatologische Erkrankungen und Arthritiden, traumatisch bedingte Fehlstellungen (zum Beispiel bei Kriegsversehrten) sowie endokrino-metabolische Störungen (Gicht, Hyperparathyreoidismus, Alkaptonurie) zu nennen. Eine besondere Form stellt hierbei die Arthrosis haemophilia dar, welche als Folgeerscheinung permanenter Gelenkeinblutungen bei Hämophilien zu werten ist. Auch wurde berichtet, dass chemische Faktoren (z.B. Warfarin-Derivate) arthrotische Vorgänge begünstigen können [8].

Die möglichst frühzeitige Diagnose der entsprechenden Pathologie, beziehungsweise deren schädigender Wirkung auf den Knorpel ist daher von immenser Bedeutung:

Somit wäre es möglich, die Progredienz der degenerativen Veränderungen zu verlangsamen oder zum Stillstand zu bringen, was zum Beispiel durch orthetische Hilfsmittel oder operative Verfahren gelingen kann [9].

1.1.3 Epidemiologie

Laut WHO hatte die Arthrose im Jahr 2000 weltweit unter den Erkrankungen des Bewegungsapparates den größten Anteil [10]. Zudem ist sie mit einer altersabhängig gesteigerten Prävalenz behaftet; diese beträgt bei 20-Jährigen etwa 9 %, steigt jedoch bei über 65-Jährigen bis auf mehr als 90 % an [11]. Da gleichzeitig die demografische Entwicklung zu einem immer weiter steigenden Anteil älterer Menschen an der Gesamtbevölkerung tendiert [12], ist somit von einem zukünftig erheblich wachsenden Kostenfaktor für das Gesundheitswesen der westlichen Industrieländer auszugehen. Zu beachten ist hierbei, dass epidemiologische Studien zum Thema Arthrose häufig sehr unterschiedliche Ergebnisse aufweisen [11]. Dies ist überwiegend der nicht einheitlichen Standardisierung bei radiologischer Befunderhebung unter Berücksichtigung der klinischen Beschwerdesymptomatik geschuldet [11]. Häufigster Manifestationsort für arthrotische Veränderungen ist hierbei das Kniegelenk (Gonarthrose), gefolgt von Hüftgelenk (Koxarthrose), Daumensattelgelenk (Rhizarthrose), Wirbelsäulenzwischengelenken (Spondylarthrose) und Schultergelenk (Omarthrose) [10]. Beachtlich ist zudem, dass die Erkrankung in allen Studien, in denen nach Geschlecht differenziert wurde, bei Frauen deutlich größere Erkrankungshäufigkeiten aufweist [2, 10].

1.1.4 Pathogenese

Der Beginn der Degeneration verläuft häufig klinisch stumm und zeigt sich nur langsam progredient. Initial findet eine Veränderung und Erweichung der Knorpelmatrix statt, unter anderem kommt es belastungsinduziert zur Entwässerung und Demaskierung der Kollagenfasern, sowie zu einem Verlust der im Knorpel enthaltenen Proteoglykane. Dieser Substanzverlust bewirkt eine langsame Abnahme der Höhe der Knorpelschicht, es folgen horizontale und vor allem vertikale Knorpelfissuren sowie eine subchondrale Sklerosierung durch reaktive Bildung von Bindegewebe [3, 13] (Abb. 1).

Die veränderten Belastungsmuster für den Rand der Gelenkfläche mit einwirkenden Schub- und Scherkräften setzen autoreaktive Mechanismen in Gang, welche die

Ausbildung knöcherner Auswüchse und Wülste zur Folge haben [3, 13]. Diese werden als Osteophyten bezeichnet. Der Knorpel wird durch die mechanische Belastung immer weiter abgetragen, gleichzeitig verkleinert sich die Kraft aufnehmende Fläche im Gelenk immer mehr; die Belastung der weiterhin beanspruchten Areale maximiert sich im gleichen Maße. In diesen Arealen bildet sich das Knochengewebe zurück, es entstehen die solitären Geröllzysten. Die beschriebenen Phänomene können jahrelang mit absoluter Symptombefreiheit bei den betroffenen Patienten einhergehen, sind jedoch mitunter bereits in der röntgenologischen Bildgebung zu erfassen [3]. Letztendlich sind die genauen Abläufe der histopathologischen Veränderung des Knorpels noch nicht vollständig verstanden.

Erfahren die abbauenden Prozesse eine deutliche Beschleunigung, kann die Phase der aktivierten Arthrose erreicht werden. Hierbei akkumulieren Knorpelabbauprodukte in Form von Proteasen, Kininen und Peptiden im Gelenkspalt und führen sekundär zu einer Entzündung des Synovialgewebes. Durch die Synovialitis verschlechtert sich wiederum die Ernährungssituation des Knorpels. Daraus resultiert der totale Abbau der intraartikulären Knorpelsubstanz und die Freilegung des subchondralen Knochens; die komplette Biomechanik des Gelenkes gerät im weiteren Verlauf in ein Ungleichgewicht; es kommt zu Fehlbelastungen und weiteren Entzündungsreizen [3, 13].

Entzündungsbedingt verkürzen sich zudem die Weichteile (sogenannte strukturelle Kontraktur), sowie die betroffene Muskulatur. Hierdurch schrumpft die Gelenkkapsel in sich zusammen, die Weite des Gelenkspaltes vermindert sich. In der Folge kommt es zur fortschreitenden Bewegungseinschränkung des Gelenkes, zu Achsen-Abweichungen und Fehlstellungen [13, 14]. Bei annähernd vollständigem Verlust der Knorpelsubstanz kann es mitunter sogar zu Synostosierungen und somit zur vollständigen Einsteifung des Gelenkes (Ankylose) kommen [14]. Zur Klassifizierung kann der Grad der Schädigung arthroskopisch durch Betrachtung der Knorpeloberfläche des Gelenks festgestellt werden. Dabei können nach Outerbridge vier Grade der Knorpelschädigung, wie in folgender Tabelle dargestellt, differenziert werden [15].

Defekt Grad	Arthroskopischer Befund
0	Normaler Knorpel
1	Vereinzelt oberflächliche Fissurenbildung, leichte Erweichung
2	Läsionstiefe < 50 % der Knorpeldicke
3	Läsionstiefe > 50 % der Knorpeldicke
4	Freilegung des subchondralen Knochens

Tabelle 1: **Einteilung der Knorpelschädigung nach Outerbridge [15]**

1.1.5 Klinik

Die Beschwerdemuster bei der Arthrose werden hochgradig vom Fortschreiten der pathomorphologischen Veränderungen bestimmt.

Während sich im Initialstadium der Erkrankung lange Zeit keine Symptome zeigen, kommt es meist erst mit Progredienz der aktivierten Arthrose zu relevanten klinischen Zeichen [3, 11]. Hierzu gehören vor allem der belastungsabhängige Schmerz durch Dehnung der gereizten Synovia und Belastung der vorgeschädigten Gelenkflächen, durch Reizerguss bedingte Gelenkschwellungen sowie durch Schonhaltung verursachte muskuläre Verspannungen [3, 11]. Die mangelnde Spezifität der Beschwerden erschwert häufig eine korrekte Diagnosestellung zu diesem Zeitpunkt [11]. Im späteren Verlauf zeigen sich vor allem ein nachts auftretender Ruheschmerz sowie eine zunehmende Druckdolenz der Gelenkkapsel (Kapselmuster); die beteiligten Muskeln verhärten sich und bilden Kontrakturen aus, die Bewegungsmöglichkeiten des Gelenkes werden eingeschränkt. Zu diesem Zeitpunkt ist ein Nachlassen des Schmerzes bei Gebrauch des Gelenkes typisch, die Patienten berichten häufig von einem „Anlaufschmerz“, welcher nach kurzzeitiger Belastung nachlasse, zum Beispiel nach kürzerer Gehstrecke im Falle der Koxarthrose [3, 9, 11]. Die ebenfalls zunehmende Weichteilentzündung sowie die Deformitäten der Gelenkzone engen den Bewegungsradius des Gelenkes jedoch immer mehr ein. Da zudem die

Beanspruchung der beteiligten Muskulatur weitestgehend abnimmt, kommt es hier zu Atrophien, die Gebrauchsminderung des Gelenkes schreitet weiter voran, es drohen vermehrt Deformitäten oder Einsteifungen [16]. Langfristig gesehen käme es sogar zu einer dauerhaften Invalidität des Patienten, insofern keine Therapie erfolgt [16].

1.1.6 Diagnostik

Da zumeist bei klinisch relevanter Beschwerdesymptomatik bereits ein fortgeschrittenes Stadium der Arthrose erreicht ist, nehmen nicht-invasive bildgebende Verfahren zur frühzeitigen validen Detektion struktureller Veränderungen in ihrer Bedeutung stetig zu. Daneben existieren weitere standardisierte Methoden zur Diagnostik.

1.1.6.1 Aktuelle Möglichkeiten der klinischen Diagnostik

Die Diagnose der Arthrose sollte durch die Kombination von Anamnese, Untersuchungsbefund des Gelenkes und bildgebender Befundung erfolgen, da die Resultate im Einzelnen stark divergieren können [11]. Eine hochspezifische Laboruntersuchung ist bisher nicht etabliert [11, 14]. Anamnestisch relevant wären Fragestellungen dahingehend, ob ein Ruhe- oder Belastungsschmerz vorliegt, ob Wärme eine Linderung der Beschwerden ermöglicht oder ob der bereits erwähnte Anlaufschmerz mit folgendem Nachlassen der Schmerzintensität bemerkt wurde. Die klinische Untersuchung des Gelenkes sollte den Ausschluss von Schwellungen, Ergussbildung, Gelenkspaltminderung, Druckschmerzhaftigkeit, Bewegungseinschränkungen und Kontrakturen beinhalten [9].

1.1.6.2 Röntgenradiologische Diagnostik

Das konventionelle Röntgenbild ist bei manifesten Veränderungen der makroskopischen Anatomie des entsprechenden Gelenkes hilfreich. Somit sollte bei klinischem Verdacht auf eine Arthrose eine a.p.-Aufnahme des entsprechenden Gelenkes angefertigt werden, gegebenenfalls sollten Spezialaufnahmen erfolgen (z.B. eine Lauenstein-Aufnahme bei Koxarthrose mit Ganzbeinaufnahmen zur Beurteilung der Beinachsen). Folgende Veränderungen sind durch konventionelle Röntgenaufnahmen oder CT detektierbar [14, 16] (Abb. 1 und 2):

- Gelenkspaltminderungen als Ausdruck der degenerativ bedingten Weichteilverkürzungen
- Ausbildung ossärer Knochenfortsätze (Osteophyten)
- Sklerosierung subchondraler Strukturen
- Geröllzysten (Eintritt von Synovialflüssigkeit in tiefer liegende Knochenschichten durch Bildung feiner Risse)
- freie Gelenkkörper
- Deformitäten

Das Röntgenbild erlaubt zudem zusätzlich die Diagnostik etwaiger prädisponierender Gelenkstörungen oder sonstiger Veränderungen, wie zum Beispiel eines Morbus Perthes oder einer angeborenen Hüftdysplasie. Der Nachteil der Bildgebung liegt in der fehlenden Darstellung der Weichteilstrukturen; eine Detektion von Veränderungen der Synovia, der Kapsel oder der Gelenkfläche ist somit nicht möglich.



Abb. 1: **Ossäre Veränderungen im Röntgenbild einer Articulatio coxae (rechts): Subchondrale Sklerosierung, Gelenkspaltminderung, Geröllzysten**



Abb. 2: **Ossäre Veränderungen im Röntgenbild einer Articulatio coxae (links): Osteophyten, Gelenkspaltniederung, subchondrale Sklerosierung, Geröllzysten**

1.1.6.3 Arthroskopie

Da die Diagnosestellung bei Arthrose überwiegend anhand klinischer Symptome sowie radiologischer Auffälligkeiten erfolgt [9,11] und durch die MRT-Bildgebung zunehmend eine valide Gelenkbinnendiagnostik bei unklaren oder therapierefraktären Beschwerden zur Verfügung steht [3], stellt die operative Arthroskopie keine relevante Säule der reinen Diagnostik dar. Allerdings kann dieses Verfahren zur weiteren Beurteilung des vorhandenen Knorpelschadens genutzt werden, wenn ohnehin ein therapeutischer Ansatz verfolgt werden soll, zum Beispiel bei einer arthroskopischen Lavage oder Knorpelglättung [17]. Zur Anwendung kommt dieses Prinzip unter anderem routinemäßig bei Pathologien im Kniegelenk.

1.1.6.4 MRT-Bildgebung

Die MRT-Bildgebung liefert dem Untersucher die Möglichkeit nicht-invasiv und sehr sensitiv Veränderungen in den Gewebeweichteilen der Gelenke zu erfassen. Je nach Protokoll können zum Beispiel Sklerosesäume oder Knorpelödeme vor allem durch fettunterdrückende Sequenzen (*SPGR*, *FLASH*) sichtbar gemacht werden [5, 18, 19].

Zudem sind MR-Arthrografien durch Injektion gadoliniumhaltiger Kontrastmittel möglich (Abb. 3).

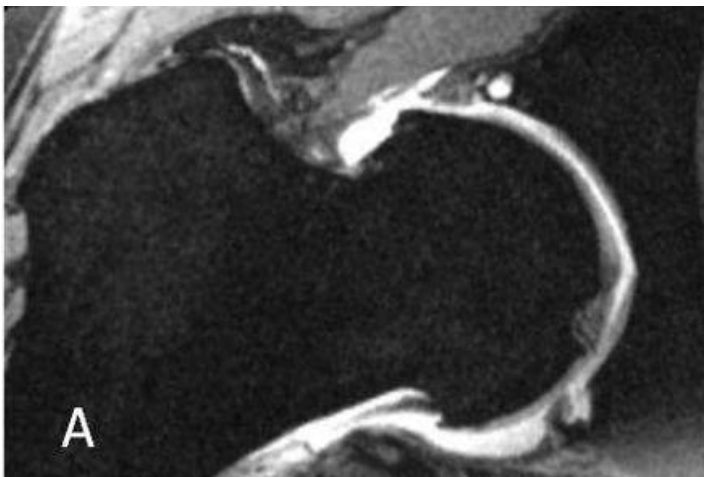


Abb. 3: Direkte MR-Arthrografie einer Articulatio coxae mit Kontrastmitteldarstellung. Abbildung nach [20].

Das MRT hat sich dennoch im klinischen Alltag aktuell noch nicht vollständig als Standarddiagnostik für die Arthrose durchgesetzt, da die zugrundeliegenden detektierbaren Weichteilschäden, wie ausgeprägte Knorpelläsionen, die reaktive Synovialitis oder ödematöse Veränderungen des subchondralen Knochengewebes durch das Verfahren erst relativ spät nachweisbar sind. Eine klinisch relevante Beeinträchtigung der Gelenkwertigkeit liegt zu diesem Zeitpunkt häufig bereits vor [21], was den Vorteil gegenüber röntgenologischen Techniken relativiert. Bezüglich der Beurteilung von frühen Veränderungen des Gelenkknorpels zeigten native MRT-Untersuchungen am Beispiel des Hüftgelenkes zudem eine zu geringe Sensitivität [22]. Ein Hauptgrund hierfür scheint die schlechte Darstellbarkeit der verhältnismäßig dünnen Knorpelschicht zu sein [3]. Uhl et al. konnten 1998 bei Vergleichsuntersuchungen zwischen histologischen und nativen MRT-Befunden an Kniegelenken aufzeigen, dass gerade bei dünnen Knorpelschichten der Schichtaufbau in den MRT Bildern nicht immer mit der tatsächlichen histologischen Schichtung übereinstimmte [23]. Degenerative Knorpelschäden konnten hier erst bei

weitgehender Schädigung der obersten Knorpelschicht detektiert werden [23]. In einer weiteren Studie aus dem Jahr 2003 wurden MR-Arthrografien retrospektiv mit intraoperativen Befunden bei offener Hüftoperation verglichen. Die Sensitivität schwankte sehr deutlich zwischen den beiden Untersuchern und lag bei einem von Ihnen bei lediglich 50 % [24].

Auch wegen der weiterhin recht hohen Kosten für die MR-Untersuchungen konnten sich diese bisher nicht als Routinediagnostikum für frühe degenerative Knorpelveränderungen durchsetzen.

Neue Studien allerdings belegen, dass es bereits ohne klinisch apparente Zeichen der beginnenden Arthrose manifeste Veränderungen der beteiligten Gelenkstrukturen gibt, welche durch MRT-Verfahren nachweisbar sind. So konnte zum Beispiel eine sehr früh einsetzende lokale Verdickung des Gelenkknorpels nachgewiesen werden [25].

Zudem stehen zunehmend Sequenzen zur Beurteilung der Knorpelstruktur auf molekularer Ebene zur Verfügung. Das kontrastmittelgestützte Verfahren *dGEMRIC* (*delayed Gadolinium Enhanced Magnetic Resonance Imaging of Cartilage*) zum Beispiel erlaubt die Quantifizierung der im Knorpel enthaltenen Glykosaminoglykane (GAG) mittels Messung der $T1_{Gd}$ -Zeiten bei Verwendung des Kontrastmittels Gadolinium [26]. Selbst kurzfristige Veränderungen des GAG-Gehaltes, wie zum Beispiel nach intensiver sportlicher Belastung, ließen sich in Versuchen sehr dezidiert erkennen [27]. Es ist zu erwarten, dass solche erweiterten MRT-Verfahren zukünftig eine deutlich größere Rolle in der Diagnostik der Arthrose spielen werden als bisher. Eine weitergehende Ausführung hierzu erfolgt im Kapitel 1.2.

1.1.7 Therapie

Zur Therapie der degenerativen Gelenkerkrankungen stehen neben operativen Verfahren auch zahlreiche konservative Methoden zur Verfügung. Anhand dieser Tatsache kommt zum Ausdruck, wie wichtig ein möglichst früher Zeitpunkt der korrekten Diagnosestellung ist.

1.1.7.1 Konservative Therapieansätze

Da zahlreiche Risikofaktoren für die Genese der Arthrose bekannt sind, bieten sich dementsprechend einige Maßnahmen zur Prävention an. In erster Linie sollte starkem Übergewicht und latenter Bewegungsarmut vorgebeugt werden. Ansonsten erfolgt die

Behandlung von Arthrosen vorwiegend symptomorientiert. Bei chronischen Schmerzzuständen können Wärmebehandlungen, nichtsteroidale Antirheumatika sowie Physiotherapie (vor allem Kräftigung des Musculus quadriceps femoris) [28] angewendet werden. Eine physikalische Therapie zur Behebung der Muskelverspannungen ist ebenfalls sinnvoll. Bei Therapieresistenz kann eine intraartikuläre Injektion von Kortikosteroiden bei aktivierter Arthrose erfolgen [9]. Die Wirksamkeit der Anwendung sogenannter Chondroprotektiva (Glucosamine und Chondroitin als Nahrungsergänzungsmittel) ist äußerst umstritten und zeigte in aktuellen Studien keine signifikante Überlegenheit gegenüber dem Placebo [29]. Bei Schädigungen im Bereich der unteren Extremität können zudem orthetische Hilfsmittel wie Einlagen, Schuhzurichtungen, Orthesen oder Gehhilfen ein vermindertes Fortschreiten der Degeneration bewirken [9, 28].

1.1.7.2 operative Therapieansätze

Zunächst bieten sich operative Therapien für alle Pathologien an, welche eine Formstörung des betreffenden Gelenkes als Prädisposition für eine sekundäre Arthrose darstellen. Hierbei wären zum Beispiel die arthroskopische Sanierung einer septischen Arthritis oder eine Varisationsosteotomie im Sinne des *Containments* bei M. Perthes zu nennen [30].

Es stehen zudem eine Reihe invasiver Maßnahmen zur Behandlung einer diagnostizierten Arthrose zur Verfügung:

Zu den Verfahren für die arthroskopische Knorpelbehandlung zählen die Knorpelglättung mit einer Fräse oder mittels Laser, Osteophytenabtragungen, die Entfernung von freien Gelenkkörpern und die Resektion geschädigter Synovia im Rahmen der aktivierten Arthrose [31]. Durch eine anschließende Lavage sollen Gewebebestandteile und Mediatoren entfernt werden, welche eine phlogistische Wirkung auf die Gelenkkompartimente haben können [32]. Eine weitere Möglichkeit der Behandlung unter der Arthroskopie besteht in der Pridie-Bohrung der betroffenen Gelenkfläche, hierbei kann die Bildung von Ersatzgewebe aus Faserknorpel durch Einwanderung von mesenchymalen Stammzellen induziert werden [33, 34]. Bei der autologen Chondrozytentransplantation (ACT) werden dem Patienten zuvor entnommene und kultivierte Knorpelstammzellen in den Knorpeldefekt injiziert und mit einem Periostlappenimplantat übernährt [35]. Bei neueren Techniken ist es möglich, die

Zellen zuvor auf ein allogenes Kollagenmedium aufzutragen. Diese Verfahren zeigen gute Frühergebnisse bei Patienten mit intaktem osteochondralen Übergang und lokal begrenzten Knorpeldefekten [35].

Eine akute operative Verbesserung der Belastungssituation kann durch Umstellungsosteotomien erreicht werden [9]. Dies bietet sich vor allem bei manifesten Achsenfehlstellungen an, setzt jedoch eine genaue klinische und radiologische Analyse der Gelenkmechanik voraus. Für das Beispiel Koxarthrose bei Dysplasie seien hier die Triple-Osteotomie mit Einschwenkung des Acetabulums sowie die Umstellungsosteotomie nach Salter genannt [36]. Im Falle einer Gonarthrose kämen eventuell valgi- oder varisierende Osteotomien am Femur in Frage.

Als ultima ratio bei therapierefraktären Knorpeldestruktionen und hohem Leidensdruck der betroffenen Patienten kommen letztendlich nur die operative Arthrodesse oder die Implantation einer alloplastischen Gelenkprothese in Betracht. Dies hat sich vor allem bei fortgeschrittener aktivierter Arthrose des Knie- oder Hüftgelenkes bewährt (Total- oder Hemiendoprothese) und wird in zunehmender Zahl in Deutschland durchgeführt [37].

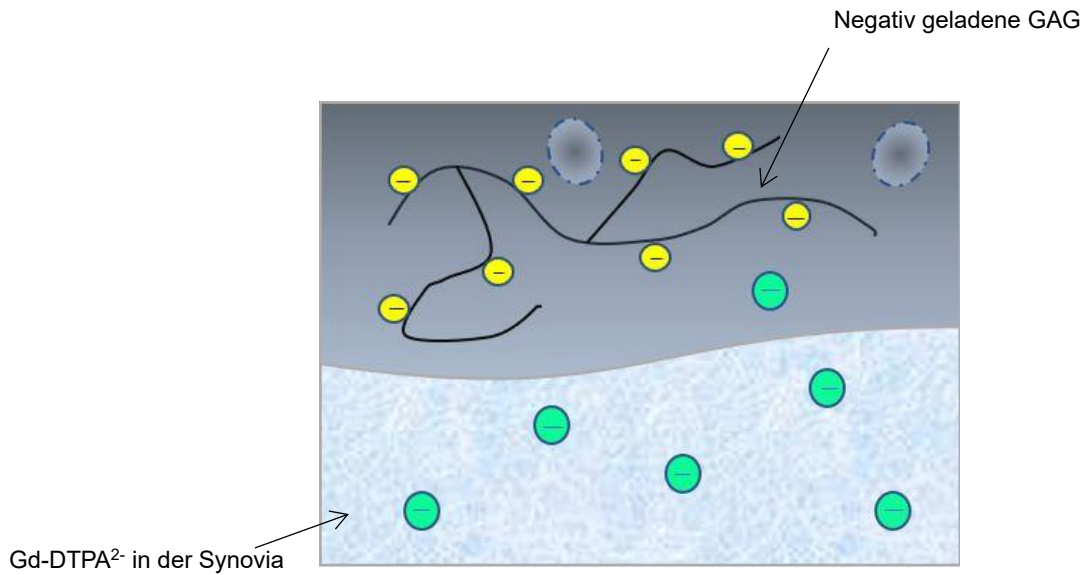
1.2 delayed Gadolinium-Enhanced Magnetic Resonance Imaging of Cartilage (dGEMRIC)

Die Knorpelsubstanz besteht neben der zellulären Fraktion (bis 10 % der Gesamtmasse), zu welcher Chondroblasten, Chondrozyten und Chondroklasten gezählt werden, vor allem aus der interzellulären Matrix. Diese wird von den Chondrozyten gebildet, deren Anzahl mit zunehmendem Alter stetig abnimmt [38]. Die Chondrozyten formieren sich im hyalinen Gelenkknorpel zu Gruppen, sogenannten Chondronen. Die interzelluläre Matrix wiederum wird zum Großteil aus Wasser gebildet, enthält jedoch auch Faseranteile welche im hyalinen Gelenkknorpel vor allem aus Kollagen II (90 - 95 %), Kollagen IX und Kollagen XI bestehen [39]. Zu dieser Matrix werden zudem Proteoglykane und deren Hauptbestandteil, die Glykosaminoglykane (saure Polysaccharide, bestehend aus Disaccharideinheiten mit Aminozuckern und Uronsäure) gezählt. Die Kollagene bilden hierbei komplexe Verbindungen mit dem Proteoglykangerüst und schaffen so die Grundstruktur der Knorpelsubstanz. Den größten Anteil an den Proteoglykanen stellen die Aggrecane. Diese wiederum bestehen aus einem Core-Protein, an welches negativ geladene GAG gebunden sind.

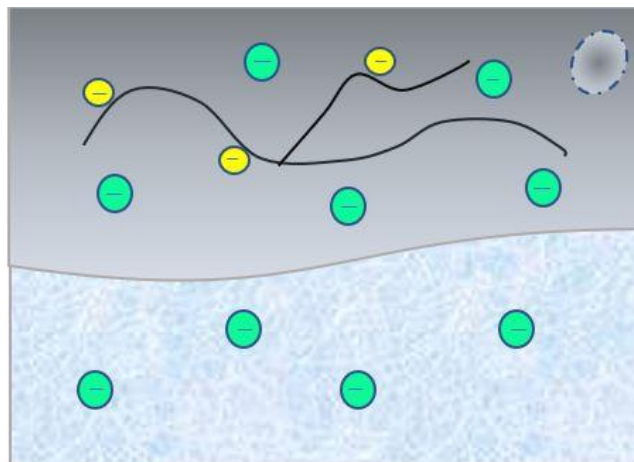
Die GAG sind aufgrund ihrer polyanionischen Eigenschaft für die Hydratisierungsfähigkeit des Knorpels verantwortlich und bewirken die hohe Elastizität des Gewebes [40]. Hier besteht der Ansatzpunkt für moderne biochemisch sensitive MRT-Verfahren: Der Gehalt an GAG des Knorpels kann durch das *dGEMRIC*-Verfahren ermittelt werden [26], welches auch an Standard-MRT-Geräten problemlos Verwendung finden kann. Grundlage für die Messung ist das anionische Kontrastmittel Gadolinium (Gadopentat-Dimeglumin-Komplex), welches nach intravenöser Injektion zerfällt und das negativ geladene Gadopentat²⁻ freisetzt (*Gd-DTPA²⁻/Gadolinium Diethylene Triamine Pentaacetic Acid*). Gadolinium stellt bereits heute den Goldstandard für Kontrastmittelgestützte Untersuchungen in der klinischen Praxis dar. Grundlage des Verfahrens ist, dass die GAG aufgrund überzähliger Kohlenstoff- und Schwefel-Gruppen negativ geladen sind und im physiologischen pH-Milieu ionisiert vorliegen. Gd-DTPA²⁻ diffundiert ins Knorpelgewebe und verteilt sich antiproportional zum Gehalt der ebenfalls negativ geladenen GAG [41]. Demnach ist die Anreicherung von Gd-DTPA²⁻ in gesundem Knorpel niedrig, jedoch in geschädigtem Knorpel mit einem verminderten Gehalt an GAG entsprechend hoch (siehe Abbildung 4). Bei Knorpelerkrankungen, wie zum Beispiel der Arthrose, kommt es zu einer Verminderung der extrazellulären Matrix und besonders des GAG-Gehalts [42]. Somit wäre vor allem in diesem Fall mit einer vermehrten Anflutung von Gd-DTPA²⁻ zu rechnen, welches sich in entsprechend niedrigen T1_{Gd}-Zeiten äußern würde, da diese in Anwesenheit von Gadolinium verkürzt wird [41]. Neben Untersuchungen am hyalinen Knorpel wird das Verfahren auch zunehmend zur Beurteilung von Faserknorpel angewendet, zum Beispiel bei Studien zur Beurteilung der Folgeerscheinungen an den GAG der Disci intervertebralia nach verschiedenen operativen Stabilisierungsverfahren [44].

In diversen Vorstudien konnte bereits die Korrelation zwischen *dGEMRIC*-Resultaten und biochemisch-histologischen Messungen von GAG im Knorpel validiert werden [41, 43, 44]. Darüber hinaus wurden physikalische Nebeneffekte durch das Kontrastmittel Gadolinium untersucht und unter anderem eine Anwendung bei 3.0 Tesla, welche in dieser Studie erfolgte, als durchführbar erachtet [45]. Die zugrunde liegenden Vorgehensweisen in Bezug auf den optimalen Zeitpunkt der Messungen nach Gabe des Kontrastmittels, die Anpassung radiologischer Parameter sowie die Wahl der *Regions of Interest (ROIs)* wurden in Protokollen erfolgreich standardisiert und die

Reproduzierbarkeit der Ergebnisse belegt [46 - 54]. Zudem konnte anhand der Verwendung von speziellen 3D-Sequenzen ein mehrdimensionales *Mapping* der zu untersuchenden Regionen ermöglicht werden [55, 56].



Gesunder Knorpel: hoher GAG-Gehalt, somit wenig Diffusion von ebenfalls negativ geladenem Gd-DTPA²⁻



Geschädigter Knorpel: verminderter GAG-Gehalt, somit mehr Diffusion von Gd-DTPA²⁻

Abb. 4: **Schematische Darstellung der Diffusion von Gadolinium-Anionen in gesundem und geschädigtem Knorpel**

1.3 Studienziel/Fragestellung

Sowohl in Deutschland als auch in anderen westlichen Industriestaaten werden in den nächsten Jahrzehnten die Folgen des demografischen Wandels deutlich zu bemerken sein und ihre Auswirkungen auch im Gesundheitswesen offenbaren [57]. Vor allem die degenerativen Erkrankungen an Gelenken werden hier im Vordergrund stehen [57]. Untersuchungen in verschiedenen Ländern (unter anderem USA, Kanada, Großbritannien, Frankreich, Australien) haben ergeben, dass sich die jährliche ökonomische Belastung durch Erkrankungen des Bewegungsapparates bereits jetzt auf bis zu 2,5 % des Bruttonationalproduktes beläuft [58].

Nach aktuellem Stand würden die Möglichkeiten der orthopädischen Diagnostik hierbei an ihre Grenzen stoßen. Denn die mit diesen Krankheiten einhergehenden Knorpelveränderungen des hyalinen Gelenkknorpels sind in konventionellen Röntgen- und CT-Bildern erst in späten Stadien erfassbar. Auch das native MRT-Bild vermag eine Knorpeldegeneration erst bei morphologisch manifesten Schäden der Histoarchitektur des Knorpelgewebes aufzuzeigen und erlangt daher seine diagnostische Wertigkeit erst im Spätstadium der Erkrankung. Die erhöhte und bezogen auf das Lebensalter auch immer verfrühtere Inzidenz der degenerativen Veränderungen erfordert daher neue Methoden und Ansätze für diagnostische Verfahren. Somit lassen sich folgende Ziele des geplanten Projektes formulieren:

Die Möglichkeiten zur Evaluation der intravitale Knorpelqualität im Verlauf des Alterungsprozesses sollen verbessert werden. Das moderne Verfahren *dGEMRIC* erlaubt anhand von MRT-Bildern die Errechnung des Glykosaminoglykan-Gehaltes des Knorpels und ermöglicht somit nicht-invasiv eine Beurteilung der Knorpelqualität [43]. Zahlreiche Vorstudien konnten bereits die Validität und klinische Relevanz der Messergebnisse belegen [59 - 62]. Da die biochemisch sensitiven MRT-Verfahren jedoch bislang keinen Eingang in die klinische Routine gefunden haben, sind weitere Studien zur Validierung und Optimierung sinnvoll.

Ein Zielkriterium der Studie ist es, zu bewerten, ob die Resultate der *dGEMRIC* Untersuchungen mit den tatsächlichen, beziehungsweise den histologischen Befunden übereinstimmen. Bisher erfolgte Forschungsarbeiten konnten zwar eine Korrelation mit histologischen Quantifizierungen nachweisen [46], verwendeten jedoch ausschließlich Präparate arthrotisch veränderten Knorpels. Die Veränderungen der morphologischen, biomechanischen und biochemischen Eigenschaften des

Gelenkknorpels in Folge degenerativer Erkrankungen sind in vorhergehenden Studien ausführlich untersucht worden [13, 14, 19]. Jedoch ist bisher nicht ausreichend geklärt, ob präarthrotische Veränderungen des Gelenkknorpels, wie eine Konzentrationsminderung der GAG, auch in Abwesenheit klinischer Arthrosezeichen auftreten. Desweiteren ist unklar, mit welchen funktionellen, biochemischen und histopathologischen Parametern diese etwaigen Veränderungen korrelieren. Die Studienlage hierzu soll erweitert werden.

Zur Bearbeitung dieser Fragestellungen werden in Kooperation mit der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Knorpelpräparate aus 20 Hüftgelenken von 20 Schafen verschiedener Altersgruppen gewonnen (jung/ Lämmer: < 6 Monate, mittelalt/ Schafe: > 2,5 Jahre). Für das geplante Projekt wird es nicht zur zweckgerichteten Tötung von Tieren kommen. Die Präparate werden Tieren entnommen, welche aus einem regulären Schlachtbetrieb entstammen. Nach entsprechender Aufbereitung werden die Knorpelpräparate mittels der *dGEMRIC*-Technik durch das Institut für diagnostische Radiologie untersucht. Schließlich werden im orthopädischen Forschungslabor die histologische Evaluation der Präparate sowie eine teilweise auf Immunfärbungen basierende, quantitative Bestimmung der GAG und des Kollagens II durchgeführt. Die Resultate werden mit denen der MRT-Bildgebung verglichen.

1.4 Das Schaf als Tiermodell in der Orthopädie

Für die vorliegende Studie ist es von besonderer Relevanz Gelenkknorpelproben in hoher Anzahl zur histologischen Auswertung zu akquirieren und dabei vor allem hinsichtlich der Studienziele auf Individuen zurückgreifen zu können, welche nicht unter klinisch relevanten Gelenkerkrankungen leiden. Die Verwendung von Versuchstieren ist somit aus ethischen Gründen nicht zu umgehen. Zwar unterliegen auch sämtliche Wirbeltiere (vor allem Nutztiere) gewissen Formen arthrotischer Veränderungen [63], jedoch sind diese bei jungen und ausschließlich auf der Weide gehaltenen Tieren nur mit geringer Wahrscheinlichkeit zu erwarten. Bei der Wahl des entsprechenden Tiermodells sind aktuelle Kenntnisse über die Biologie, Physiologie und Pathologie der in Frage kommenden Tierspezies sowie die Übertragbarkeit auf die Situation des Menschen zu berücksichtigen. Es ist hierbei jedoch grundsätzlich zu beachten, dass es sich bei jedem Tiermodell jeweils nur um eine Annäherung an

humananatomische Verhältnisse handeln kann und auf Grund der einzigartigen Fortbewegungsmethode des Menschen ein vollständig äquivalentes Modell nicht existiert [64]. In der orthopädischen Forschung hat sich nun das Schafsmodell besonders bewährt; seit Ende der 1990er Jahre hat der Anteil an orthopädischen Studien mit Verwendung dieses Tiermodells stetig zugenommen [64]. Besondere Erkenntnisse konnten zum Beispiel im Bereich der Knochendefektheilung [65], der Osteoporose [66] und auch der Arthrose [67, 68, 69] erzielt werden. Die Gründe für diese besondere Eignung liegen in der Knochenstruktur, der histologischen Architektur des Schafsknorpels sowie dem mechanischen Belastungsmuster des für diese Studie besonders relevanten Hüftgelenks. Im Einzelnen:

Das Schaf weist in der makroskopischen Anatomie des Femurs große Ähnlichkeiten zum Menschen bezüglich der Größe und der Proportionen auf; es ist lediglich ein etwas ovalerer Femurkopf mit gleichzeitig flacherem Acetabulum zu beobachten [70], welcher eine etwas weiter posterior gelegene Hauptbelastungszone zur Folge hat. Die Durchblutung stellt sich anatomisch annähernd gleich zum menschlichen Gefäßsystem dar [70]. Gewisse Unterschiede zeigen sich zwar in der Knochenstruktur; allerdings scheinen sich wiederum die Umbauprozesse des Lamellenknochens bei den Spezies Schaf und Mensch zu ähneln, da sich in Studien vergleichbare Regenerationsraten nach Osteosynthese fanden [71]. Ein sehr wichtiges Kriterium für die Wahl des Schafsmodells stellt die grundlegende Ähnlichkeit beim histologischen Aufbau des Knorpels dar. Auch Schafe zeigen den strukturierten zonalen Aufbau des hyalinen Knorpels, eine ähnliche Chondrozyten-Morphologie und das Vorhandensein von Kollagenen und Proteoglykanen [72]. Unterschiede finden sich hier allerdings zum Beispiel in der Verteilung der GAG innerhalb der Schichten sowie in der strukturellen und räumlichen Zusammensetzung der extrazellulären Matrix [72, 73]. Jedoch bleibt zu erwähnen, dass das Schaf als Großtier bezogen auf die Knorpeldicke mit ca. 0,8 mm nur eine bedingte Annäherung an die Spezies Mensch darstellt, dessen Knorpeldicke bis zu 2,4 mm beträgt [72]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in mehreren tierexperimentellen Versuchen der hyaline Gelenkknorpel von Großtieren bei rein chondraler Verletzung ebenso ungünstige Regenerationstendenzen aufweist, wie der des Menschen [72]. Die mechanischen Kräfte, welche auf die Extremitätengelenke einwirken, fallen bei der Spezies Schaf geringer aus als beim Menschen, begründet durch den Gang auf vier Beinen. Zusätzlich entfällt dabei ein

Großteil der Belastung auf die vordere Extremität [74], wodurch das Hüftgelenk entlastet wird. Zu beachten ist jedoch auch, dass durch die veränderten Größendimensionen diese Diskrepanzen wieder ausgeglichen werden können: Beim freien, schnellen Laufen des Schafes konnte im Versuch die höchste maximale Kraftereinwirkung auf die Gelenkflächen gemessen werden, wobei die Werte denen der Einwirkung beim Gang des Menschen entsprachen [75]. Phillips und Gurr beschrieben nach Versuchen mit künstlicher Knorpelschädigung die Hüfte des Schafes als ein sehr nützliches Modell für die Koxarthrose des Menschen, da durch die fortschreitende Degeneration annähernd gleiche Schädigungsmuster wie an der menschlichen Hüfte zu finden waren [76].

Somit basierte diese Studie ebenfalls auf dem Tiermodell Schaf, um eine bestmögliche Annäherung an den Menschen zu gewährleisten. Eine andere Rechtfertigung für diese Wahl liegt in der praktischen Durchführung: Vergleichbar große und gleichaltrige Tiere sind in großen Populationen für die Forschung gut zugänglich wobei die anfallenden Kosten vergleichsweise gering sind. Auf Grund ethischer Bedenken ist es zudem allgemein anerkannter Usus, dass Nutztiere wie Schafe, Schweine oder Ziegen als Versuchstiere gegenüber anderen Tieren bevorzugt werden, welche dem Umfeld des Menschen zugerechnet werden, wie zum Beispiel Hunde [63].

2. Material und Methoden

Für die Studie wurden Knorpelproben von weiblichen Schafen zweier verschiedener Altersgruppen verwendet. Nach Entnahme der Präparate erfolgten zunächst die Markierung der *ROIs* auf den Gelenkflächen zur späteren Orientierung, sowie das Einfrieren der Proben. Zum Protokoll der MRT- Auswertung gehörte neben dem T1_{GD}-Mapping auch eine orientierende *DESS*-Sequenz. Nach chemischer Dehydrierung und anschließender Einbettung in eine Acrylharzverbindung wurden von jeder Probe möglichst viele Schnitte von je 50 µm Dicke erstellt. Im Anschluss wurden zunächst eine immunhistologische Färbung für Kollagenfasern sowie deren Auswertung durchgeführt. Die Proben konnten im weiteren Verlauf wieder entfärbt und schließlich definitiv mittels Toluidinblau-Lösungen für die Auswertung nach dem Mankin-Score

vorbereitet werden [77]. Nach Erhebung aller Werte wurde jeder einzelne histologische Schnitt mit einem topographisch kongruenten Schnittbild aus den MRT-Datensätzen abgeglichen. Die entsprechenden T1_{Gd}-Zeiten konnten den erhobenen Werten aus der GAG-Auswertung nach Mankin gegenübergestellt werden. Mit Ausnahme der Probengewinnung fanden sämtliche Arbeitsschritte in den Räumlichkeiten des Klinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf statt.

2.1 Akquisition der Versuchstiere

Sämtliche verwendeten Versuchstiere der Studie entstammen der Nutztierhaltung. Zunächst wurde die Kohorte in zwei Altersgruppen gestaffelt: Zur Gruppe 1 gehörten Lämmer, in diesem Fall Exemplare mit einem Lebensalter unter oder gleich 6 Monaten. Zur Gruppe 2 wurden erwachsene Tiere gezählt, welche ein Lebensalter zwischen 2,5 und 3 Jahren aufwiesen. Sämtliche Exemplare gehörten der Gattung Moorschnucke (*Ovis aries*) an. Die Präparate wurden nach Absprache direkt am Tag der Schlachtung aquirit. Zur Probengewinnung wurden aus Gründen der Vergleichbarkeit ausschließlich die linksseitigen Hüftköpfe der Tiere für die weiteren Untersuchungen verwendet, die rechtsseitigen Hüftköpfe kamen für Probezuschnitte und Färbeversuche zur Anwendung. Sämtliche Versuchstiere entstammen einem regulären Schlachtbetrieb zum Vertrieb von Nutztieren für landwirtschaftliche Gewerbe sowie von Verzehrfleisch für den privaten Nutzen. Die vorhergehende veterinärmedizinische Begutachtung erfolgte nach den üblichen Maßgaben. Dieses Vorgehen steht somit in Einklang mit den Tierschutzgesetzen. Die Proben der Tiere, welche zuvor für den Verzehr geschlachtet worden waren, wurden auf dem Schlachthof käuflich erworben. Somit entfiel für diese Studie die Notwendigkeit eines Votums durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität.

2.2 Gewinnung der Präparate und Markierung:

Die nach der Vorarbeit durch den Schlachter vorliegenden Skelette wurden zunächst an den unteren Extremitäten von Muskelresten und Sehnenansätzen befreit; die zu untersuchende *Articulatio coxae* wurde aufgesucht und vorsichtig inzidiert. Es erfolgten die Durchtrennung des *Ligamentum acetabuli* sowie der Gelenkkapsel und die vorsichtige Exartikulation unter Schonung der Gelenkflächen. Anschließend folgte der Zuschnitt am *Collum chirurgicum* mittels Bandsäge auf eine praktische Größe. Zu

diesem Zeitpunkt wurden sämtliche Präparate mit makroskopisch sichtbaren Zeichen degenerativer oder entnahmebedingter Schäden von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen und durch andere Exemplare ersetzt. Auf diese Weise gelang die Gewinnung von jeweils 10 linksseitigen Präparaten der Gruppen 1 und 2, sowie weiteren 10 Exemplaren zu Testzwecken.



Abb. 5: Präparat der Gruppe 1 (Lamm) kurz nach der Extraktion



Abb. 6: Präparat der Gruppe 1 (Lamm) nach weiterem Zuschnitt, kurz vor Markierung

Nun erfolgte die Festlegung und Markierung der späteren *ROIs*, welche für die weiterführenden Untersuchungen relevant sein würden. Diese wurden in annähernder Quadratform lateral des Ligamentum acetabuli mit einer Größe von jeweils ca. 3 cm² angelegt. Die entsprechenden Eckpunkte wurden mit Feininstrumenten angebohrt und durch monofiles chirurgisches Nahtmaterial (Orthocord®, dePuy, Kinkel, Deutschland) gekennzeichnet. Dies geschah möglichst orthogonal zur Knorpeloberfläche. Im Bereich der ventrolateralen und ventromedialen Eckpunkte der *ROIs* erfolgte zudem die Entnahme einer Knorpelstanze für ursprünglich geplante weitere biochemische Untersuchungen. Der Ansatz des Ligamentum acetabuli wurde möglichst vollständig entfernt ebenso wie überstehende oder scharfkantige Knochenfragmente.



Abb. 7: Präparat nach Markierung und Knorpelstanze



Abb. 8: Präparat nach Markierung und Knorpelstanze (In der Testphase für den Zuschnitt noch mit geflochtenem Nahtmaterial als Markierung)

Alle Proben wurden nach dieser Prozedur fotografiert, in Ringerlösung gewässert und in entsprechenden Kunststoff-Gefäßen luftdicht verpackt. Festlegung der Beschriftung: „L“ (*lamb*s, Präparate der Gruppe 1) und „S“ (*sheep*, Präparate der Gruppe 2) sowie fortlaufende Nummern und Seitenangabe. Bis zur terminierten MRT-Untersuchung wurden die Präparate bei -30°C eingefroren.

2.3 MRT-Bildgebung (dGEMRIC-Analyse und Beurteilung der Morphologie)

Die MRT Bildgebung erfolgte in Kooperation mit dem Institut für klinische Radiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf an einem 3-Tesla-System (Magnetom Trio A Tim System, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Deutschland) mit Hilfe einer 7 cm-Magnetspule.

Zum Protokoll gehörten folgende Sequenzen:

1. eine 3D *Double-Echo-Steady-State-Sequenz (DESS)* mit Wasserauszug (Repetitionszeit [TR]/ Echozeit [TE] = 16,38 ms/ 5 ms, Flip-Winkel [FA]= 25° , Anzahl der Signalmitteilungen [NEX] = 4, Bandbreite [BW] = 199 Hz/ Pixel, *Field of View [FOV]*

= 63 mm x 63 mm, Bildauflösung = 0,25 mm², Schichtdicke = 0,25 mm, Anzahl der Schichten = 208, Voxel-Größe 0,25 mm³, Akquisitionszeit [TA] = 28,48 min). Diese Sequenz diente zur Aufarbeitung der morphologischen Eigenschaften des Knorpels.

2. ein B1-vorab-Scan mit Variablen Flip-Winkeln ($TR/TE = 1000 \text{ ms}/ 13 \text{ ms}$, $FA 90^\circ/ 120^\circ/ 60^\circ/ 135^\circ/ 45^\circ$, $NEX = 1$, $BW = 260 \text{ Hz}/ \text{Pixel}$, $FOV = 250 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, Auflösung = 7,8 mm, Schichtdicke = 5 mm, Anzahl der Schichten = 20, $TA = 37 \text{ sek}$) zum Ausgleich von Inhomogenitäten des B1- Feldes.

3. eine 3D Dual-Flip-Winkel *Volumetric Interpolated Breathhold Examination*-Sequenz (*VIBE*) ($TR/TE = 11,5 \text{ ms}/ 4,6 \text{ ms}$, $FA = 23^\circ/ 4^\circ$, $NEX = 3$, $BW = 130 \text{ Hz}/ \text{Pixel}$, $FOV = 57 \times 57 \text{ mm}$, Auflösung = 0,22 mm², Schichtdicke 0,22 mm, Voxelgröße = 0,22 mm³, Anzahl der Schichten 208, $TA = 32,29 \text{ min}$) für das $T1_{Gd}$ -*Mapping*.

Somit konnte eine höhere Bildqualität mit verbesserter Auflösung auf Kosten einer verlängerten Akquisitionszeit erreicht werden.

Zu den Untersuchungen wurden die Proben der Hüftköpfe standardisiert bei Raumtemperatur über 24 Stunden aufgetaut und in einem Kunststoffbehältnis mit Ringerlösung unter der Magnetspule positioniert. Die jeweilige *ROI* zeigte hierbei orthograd nach oben. Für das $T1_{Gd}$ -*Mapping* wurde Gadolinium (30–50 ml einer 2-molaren Lösung *Gd-DTPA*, 0,5 mmol/ml, Dotarem®; Guerbet, Roissy, Frankreich) hinzugefügt; die Messung erfolgte nach 40 Minuten. Die Wirksamkeit dieses Vorgehens ist in Vorstudien beschrieben worden [78].

Zur weiteren Beurteilung und Auswertung wurden der *DESS*- sowie der *dGEMRIC*-Datensatz auf eine *Workstation* (Leonardo, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Deutschland) transferiert. Das *Multiplanar-Reformatting-Programme (MPR)* lieferte uns die Möglichkeit in der MRT-Darstellung dieselbe Schnittebene wie im entsprechenden histologischen Präparat aufzusuchen. Somit konnte jedem histologischen Schnitt ein entsprechendes MRT-Korrelat zugeordnet werden. Die genaue Orientierung erfolgte hierbei am Anschnitt der eingebrachten Markierungen oder der Ligamenta acetabuli. Für die Auswertung der Resultate wurde, analog zu den histologischen Evaluationen, jedes Schnittbild in drei Subregionen unterteilt, welche

mit A, B und C gekennzeichnet wurden. Dabei bezeichnet die Region B den Bereich zwischen den makroskopischen Markierungen im Präparat. A und C stellen jeweils den Bereich zwischen Außenrand des Präparates und der lateralen (A), beziehungsweise der medialen Markierung (C) dar.

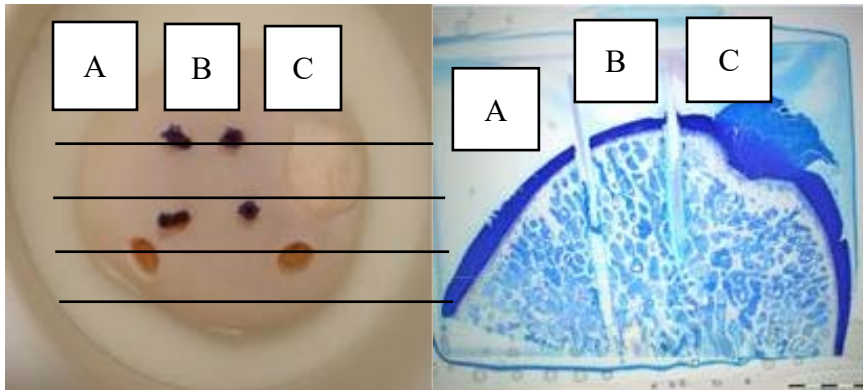


Abb. 9: Einteilung der Subregionen am Beispiel eines noch unbearbeiteten Hüftkopfes inklusive geplanter Schnittführung und eines Toluidin-gefärbten Schnittbildes

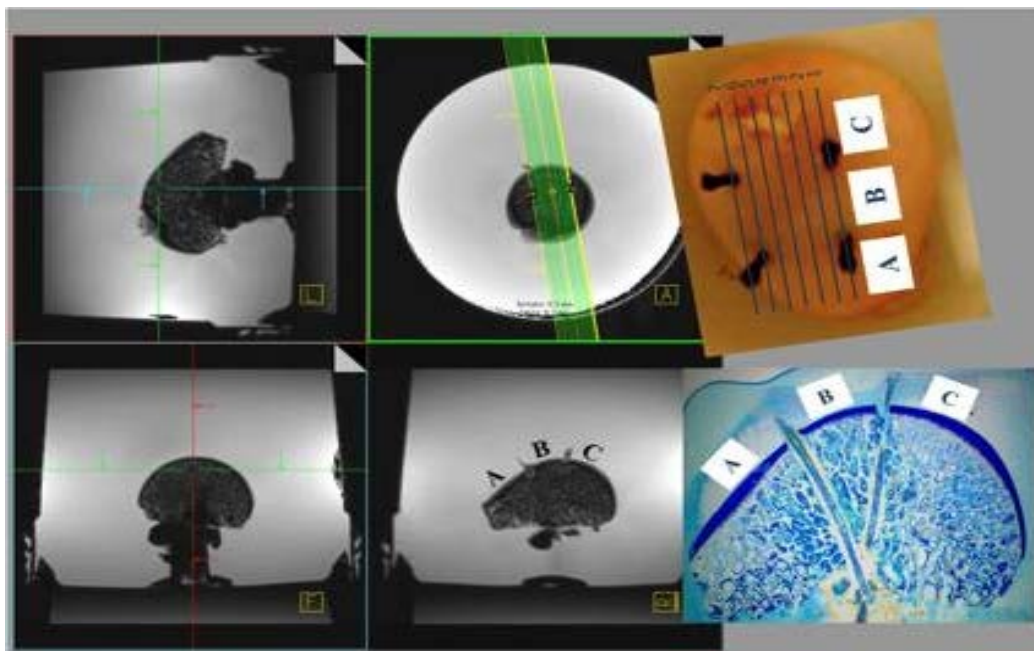


Abb. 10: Abgleich der Schnittebenen in den *DESS*-Sequenzen mit den korrespondierenden histologischen Schnittbildern (unten rechts), sowie mit den Schnittlinien in der Aufsicht (oben rechts) mittels *MPR*-Programm

Für das $T1_{Gd}$ -Mapping wurden nun *ROIs* zur Messung der $T1_{Gd}$ -Zeit in den entsprechenden Subregionen unter Ausnutzung der gesamten Knorpeldicke gesetzt. Vorstudien haben Unterschiede der GAG-Konzentration in den verschiedenen Knorpelschichten belegen können [49], daher entschied man sich, eine Gesamt- $T1_{Gd}$ -Zeit zu mitteln um Ungenauigkeiten zu vermeiden. Jeweils einer Subregion wurde eine *ROI* zugeordnet. Die *DESS*-Sequenzen dienten hierbei als Orientierung. Sämtliche *ROIs* waren von annähernd gleicher Größe.

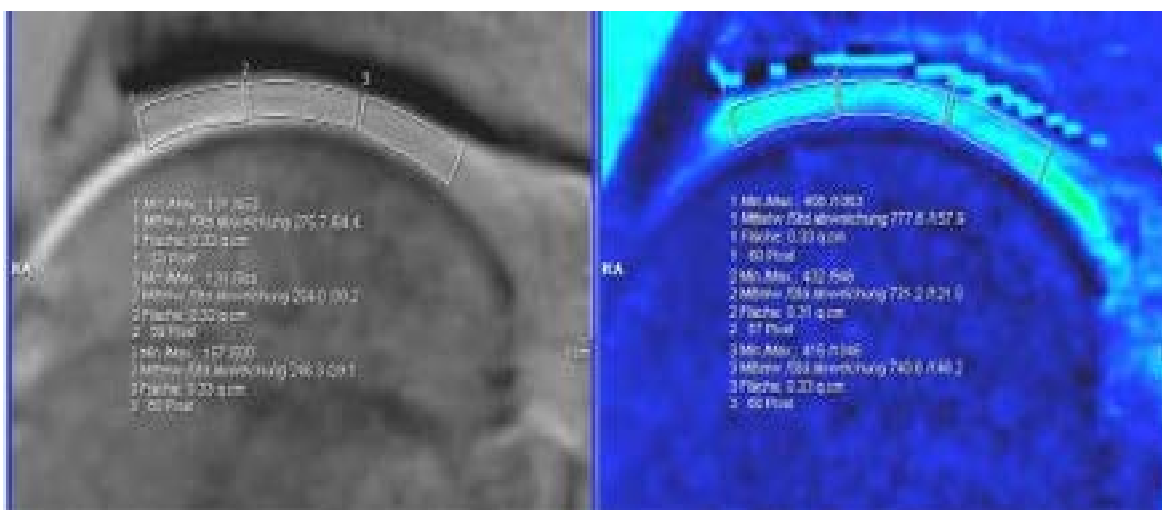


Abb. 11: Platzierung der *ROIs* innerhalb der *DESS*-Sequenz sowie des $T1_{Gd}$ -Mappings am Beispiel eines menschlichen Hüftkopfes

Anhand der *DESS*-Sequenzen wurde zudem in den Koronalebene eine morphologische Begutachtung anhand der modifizierten Outerbridge-Klassifikation nach Uhl vorgenommen [79] (siehe nachfolgende Tabelle).

Grad 0	normaler Knorpel
Grad 1	abnormales intrachondrales Signal aber normale chondrale Oberfläche
Grad 2	Knorpelläsion bis 50 % der Schichtdicke
Grad 3	Knorpelläsion über 50 - 100 % der Schichtdicke
Grad 4	Knorpelerosion bis auf den Knochen

Tabelle 2: **Darstellung der nach Uhl modifizierten Outerbridge-Klassifikation [79]**

Areale mit schlechter Auflösung oder makroskopisch sichtbarer Knorpeldegradation (Grad 2 - 4) wurden von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

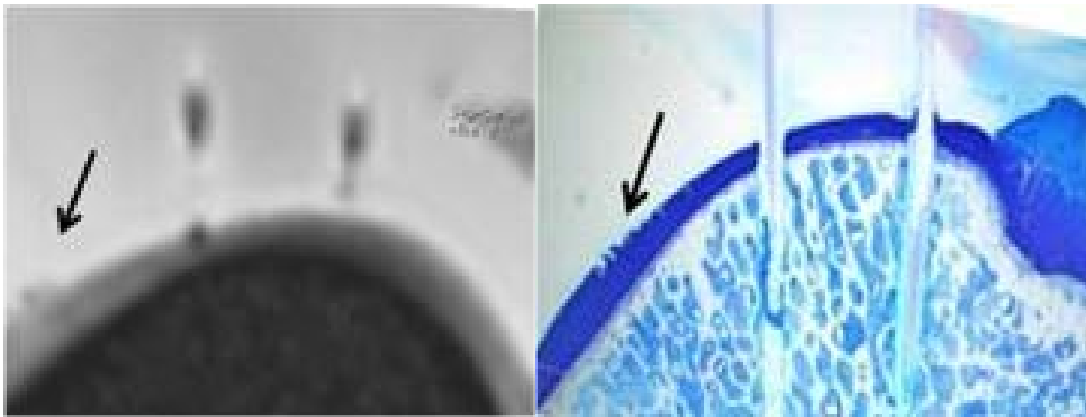


Abb. 12: **Beispiele für Befunde mit Knorpelläsionen (Outerbridge > 1), welche zum Ausschluss aus der Bewertung führten**

Innerhalb der *ROIs* wurden nun die $T1_{Gd}$ -Zeiten nach Gadoliniumgabe gemessen (*dGEMRIC*-Index). Zur Evaluation der Werte verwendeten wir eine Farbkodierung mit Darstellung in schwarz/ blau für niedrige $T1_{Gd}$ -Zeiten bis gelb/ rot für hohe $T1_{Gd}$ -Zeiten.

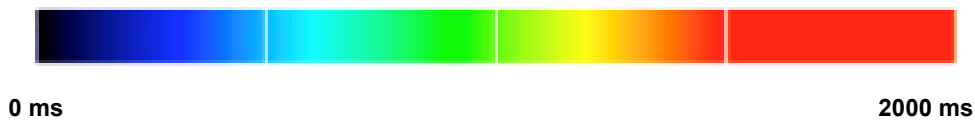


Abb.13: Farbkodierung der $T1_{Gd}$ -Zeiten

Alle Untersuchungen wurden von denselben zwei Beobachtern mit Kenntnissen der *dGEMRIC*-Darstellung und völlig unabhängig von der histologischen Evaluation durchgeführt (Blind-Ansatz). Die ermittelten $T1_{Gd}$ -Zeiten wurden gemeinsam mit der Größe der jeweiligen *ROIs* sowie der zuvor in den *DESS*-Sequenzen bestimmten Outerbridge-Klassifizierung in einer entsprechenden Tabelle vermerkt.

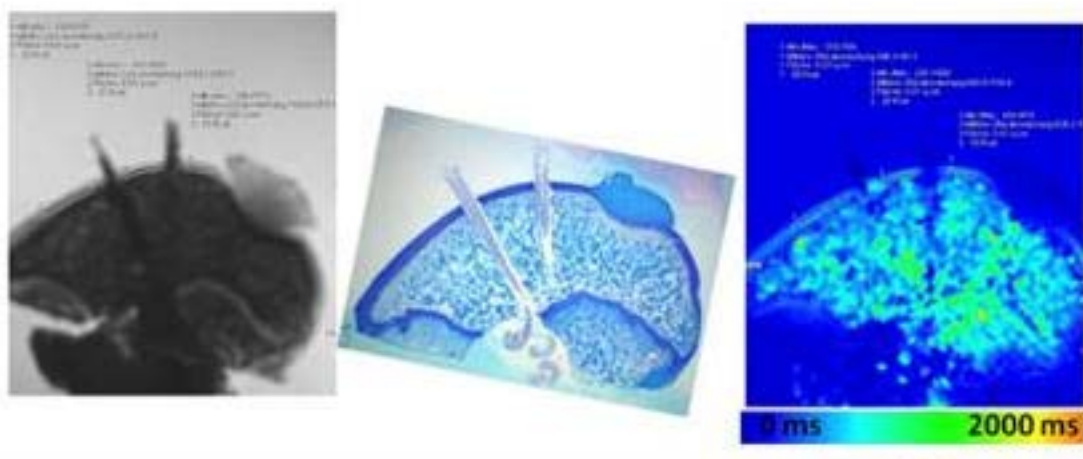


Abb. 14: Übersicht über korrespondierende *ROIs* in der *DESS*-Sequenz, dem Toluidinblau-Schnittbild sowie der farbkodierten $T1_{Gd}$ -Kartierung

2.4 Statistische Auswertung

Für alle statistischen Messungen wurde die *SPSS-Software* (Version 19.0, SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA) verwendet. Neben den durchschnittlichen $T1_{Gd}$ -Zeiten der drei Subregionen wurden auch deren Standardabweichungen gemessen. Die Student'sche T-Verteilung sollte statistisch signifikante Unterschiede zwischen den

Werten der beiden Studiengruppen aufdecken. Der Test nach Levene konnte keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Varianzen der T1_{Gd}-Zeiten feststellen. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant definiert.

2.5 Präparation zur histologischen Begutachtung

Für die histologische Aufarbeitung musste ein Verfahren etabliert werden, welches Schnittführungen durch die eingebrachten Markierungen erlaubte ohne deren Position zu verändern oder diese zu schädigen.

Nach mehreren frustrierten Versuchen der Herstellung von histologischen Schnitten am Kryostaten, welcher die Markierungsfäden nicht ohne ein Herausbrechen derselben schneiden konnte, wurde die Verwendung der Trenn-Dünnschliff-Technik beschlossen. Dies beinhaltete die Einbettung der Proben in eine Kunstharzverbindung (Technovit® 9100 System, Heraeus Kulzer, Mitsui Chemicals Group, Wehrheim, Deutschland) sowie die Anfertigung von 200 µm dicken Schnitten an einer Diamant-Bandsäge mit späterem Abschleiff. Hiermit war eine Schnitthanfertigung ohne Veränderung der Markierungspositionen gegeben. Das Verfahren wurde bereits in den 1980er Jahren etabliert [80].

2.5.1 Aufbereitung

Voraussetzung für die Präparation mit dem Technovit-System war eine möglichst vollständige chemische Dehydrierung der Hüftkopffproben.

Unmittelbar nach der Untersuchung im MRT wurden diese daher zunächst für eine Woche in 4 %ige Formalinlösung verbracht. Nach einmaliger Spülung mit destilliertem Wasser durchliefen die Proben hiernach eine aufsteigende Alkoholreihe nach dem folgenden Schema:

- 70 %iges Ethanol - 7 Tage
- 80 %iges Ethanol - 7 Tage
- 90 %iges Ethanol - 7 Tage
- 96 %iges Ethanol - 7 Tage
- 99 %iges Ethanol - 7 Tage

Hierbei wurden die Proben jeweils ohne Wässerung sofort in das nächste Alkoholbad eingebracht.

Zur weiteren Entwässerung erfolgte im Anschluss eine Waschung in 98 %igem Xylol nach dem folgenden Schema:

- Xylol 1 (bereits 1x zur Entwässerung anderer Proben genutzt) - 7 Tage
- Xylol 2 (neu) - 7 Tage

2.5.2 Einbettung

Die Proben wurden nun den verschiedenen Kunstharzlösungen (im Folgenden bezeichnet als Technovit 1 - 4) zugeführt. Die Zubereitung der einzelnen Lösungen und das Einlegen der Proben erfolgten nach dem folgenden Schema:

- Technovit 1, „stabilisiert“ (200 ml Technovit 9100 + 1 g Härterlsg. 1) - hierin 7 Tage
- Technovit 2, „entstabilisiert“ (200 ml Technovit 9100, dieses durchlief zuvor eine mit 50 g Aluminiumoxid (Al_2O_3) gefüllte Chromatografiesäule + 1 g Härterlsg. 1) - hierin 7 Tage, Lagerung bei -20°C in braunen Flaschen
- Technovit 3, Infiltrationslösung (60 g PMMA ad 750 ml Technovit 9100 + 3 g Härterlsg. 1, zuvor Lagerung bei 4°C für eine Woche) - hierin 7 Tage, Lagerung bei 4°C
- Technovit 4, Polymerisationslösung (9 Teile Lösung A (107 g PMMA ad 667 ml Technovit 9100 entstabilisiert) + 1 Teil Lösung B (8 ml Härter 2 + 4,4 ml Polymerisationsregler ad 100 ml Technovit 9100 entstabilisiert)

Im letzten Arbeitsschritt wurden die Präparate nun eingebettet. Man brachte diese in eine entsprechend große runde Kunststoffform ein, welche anschließend luftblasenfrei mit der Polymerisationslösung aufgefüllt wurde (siehe Abb. 16). Das luftdichte Verschließen mittels Deckel und die Lagerung für circa 10 Tage führten zum kompletten Aushärten.



Abb. 15: **Präparat S6 in Polymerisationslösung, kurz vor dem Eindeckeln**

Nach der Aushärtung wurden die fertigen Blöcke mit Hilfe einer Diamantbandsäge (Exakt 300 & 310 CP, Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland) zu koronalen Schnitten von jeweils 200 µm Schichtdicke verarbeitet, hierbei erfolgte ein möglichst orthogonaler Anschnitt der eingebrachten Markierungen. Alle Präparate wurden mit Hilfe eines speziellen Klebemittels (Technovit® Acrykleber 7210 VLC, Mitsui Chemicals Group, Wehrheim, Deutschland) auf Plexiglasträger geklebt. Anschließend erfolgte der Schliff auf die endgültige Schichtdicke von 50 µm über ein Mikro-Schleifgerät (Exakt 400 CS, Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland). Auf diese Weise konnten pro Hüftkopf 5 bis 8 Schnittpräparate erstellt werden.

2.6 Histologische Analyse

Zur mikroskopischen Evaluation erfolgten zunächst für alle Präparate die sogenannte Entplastung, also das Herauslösen sämtlicher Kunststoffharzanteile, sowie die immunhistologische Anfärbung der Kollagenfasern anhand spezifischer Antikörper. Nach entsprechender Auswertung wurden die Präparate mittels mehrfacher Waschung in Xylolbädern entfärbt und die endgültige Anfärbung durch Toluidinblaulösungen durchgeführt.

2.6.1 Entplasten der Präparate

Dieser Arbeitsschritt erfolgte nach Herstellerangaben (Merck, Darmstadt, Deutschland). Hierzu wurden Waschungen der Proben nach dem folgenden Schema durchgeführt:

- Xylol (98 %) - 2 x 10 Minuten
- 2-Hydroxyethyl-Methacrylat (Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland) - 2 x 10 Minuten
- Aceton - 2 x 10 Minuten
- Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, „*Phosphate-buffered Saline*“) - 3 Minuten

2.6.2 Immunhistologie

Für die Anfärbung der Kollagenfasern der Präparate wurde der *ELISA*-Kit for Collagen Type II Alpha 1 (COL2a1) der Firma USCN Life Science, Wuhan, China verwendet. Folgende Reagenzien waren hierfür nötig:

- *PBS* Waschpuffer
- *PBST* (*PBS* + 0,1 %iges Triton X-100)
- Proteinase K (Dako S3004)
- Lösung aus *PBS* und 0,5 %igem H₂O₂ (Peroxidase-Block-Reagenz)
- Proteinblockreagenz in *PBS*-Lösung
- Primärer Antikörper (Anti-*mouse*-AK/ IgG; Dako X0909); 1:200 in *PBS* verdünnt
- Sekundärer biotinylierter Antikörper (Polyklonal, *swine, mouse, rabbit, goat*, Dako E0453); 1:60 in *PBS* verdünnt
- Peroxidase-konjugiertes Streptavidin (Dako P 0397); 1:200 verdünnt in 1 %iger BSA/ *PBS*-Lösung
- *AEC Substrate-Chromogen-System* (3-amino-9-ethylcarbazole)
- Dako Ultramount (Dako S1964)
- Dako Pen (Fettsubstanz zum Abdichten)

Die Arbeitsschritte wurden für jeden histologischen Schnitt nach dem folgenden Schema durchgeführt:

- Umranden der Schnitte mit Dako Pen
- Waschung der Präparate in *PBS* mit Proteinase K im Brutschrank bei 37°C für 15 Minuten, dies sollte der Antigendemaskierung dienen
- Waschung in *PBS* für 3 Minuten
- Waschung in Peroxidase-Block-Reagenz
- Waschung in *PBS* für 3 Minuten
- Auftragen der Proteinblock-Lösung (10 %ig) für 15 Minuten, diese wird danach abgekippt
- Auftragen der primären Antikörperlösung, über Nacht bei 4°C inkubieren
- *PBS* + *PBST* + erneut *PBS* für jeweils 5 Minuten
- Auftragen der sekundären Antikörperlösung, über Nacht bei 4°C inkubieren
- *PBS* + *PBST* + erneut *PBS* für jeweils 2 Minuten
- Inkubation mit Peroxidase-konjugiertem Streptavidin für 8 Minuten bei Raumtemperatur
- *PBS* + *PBST* + erneut *PBS* für jeweils eine Minute
- Auftragen der AEC-Lösung für 5 - 30 Minuten, mikroskopische Kontrolle
- Waschung mit destilliertem Wasser für 5 Minuten
- Eindeckeln mit Dako-Ultramount
- Aushärten für mindestens 24 Stunden

2.6.3 Auswertung der Immunhistologie

Die Auswertung erfolgte nach Fotodokumentation mit der CCD-Kamera (Color View III, Olympus, Hamburg, Deutschland) in Verbindung mit dem binokularen Lichtmikroskop (Olympus BX50, Olympus, Hamburg, Deutschland) und der entsprechenden Verarbeitungssoftware (AnalySIS FIVE-docus, Soft Imaging System, Münster, Deutschland).

Die Evaluation der Färbung erfolgte nicht anhand einer makroskopischen Einteilung, sondern durch genaue Analyse der Farbintensität. Dies geschah durch die Nutzung einer Programmfunktion, welche die Konzentration von Farbpixeln innerhalb einer selbst gewählten *ROI* ermöglichte. Durch genaue Einstellung der Farbparameter auf die Rottöne der Kollagenfärbung konnte auf diese Weise der Grad der Anfärbung quantifiziert werden. Es wurde mit diesem Verfahren jede Subregion (A, B, C) der

jeweiligen Präparate untersucht. Zudem wurde auf Grund von unterschiedlichen Verteilungsmustern des Farbstoffes innerhalb der Knorpelschichten eine weitere Unterteilung der zu untersuchenden Regionen beschlossen: Jede Subregion wurde korrelierend zur anatomisch-histologischen Schichtarchitektur zusätzlich vertikal in weitere 3 Schichten unterteilt: Eine oberste Tangentialschicht, die darunterliegende Übergangszone und die Radiärzone. Somit sollten insgesamt bis zu 9 *ROIs* pro Schnittbild analysiert werden.

2.6.4 Entfärbung

Es erfolgte nach Auswertung der Immunfärbungen zunächst die Entfärbung der Präparate. Die hierfür notwendigen Schritte wurden nach dem folgenden Schema durchgeführt:

- Waschung der kompletten Präparate in 99 %igem Ethanol - 2 x 2 Minuten
- Waschung der kompletten Präparate in Xylol - 1 Minute
- Waschung in *PBS* - mindestens 10 Minuten
- Trocknen lassen für mindestens 12 Stunden

2.6.5 Toluidinblaufärbung

Für die Anfärbung mit Toluidinblau wurden die etablierten Färbelösungen nach Kiel und Donath in Kombination verwendet. Es waren folgende Reagenzien hierfür nötig (alle Produkte: Merck, Darmstadt, Deutschland):

- Wasserstoffperoxid (H_2O_2)
- Ameisensäure (4 %ig)
- DePex (Versiegelungsmedium)

- Toluidinblau nach Donath (1 l):

Lösung A:

- 800 ml destilliertes Wasser
- 8 g Natrium-Tetraborat
- 8 g Toluidinblau

Lösung B:

- 200 ml destilliertes Wasser
- 2 g Pyronin G

(Beide Lösungen wurden miteinander gemischt und für 15 Minuten mit dem Magnetrührer vermischt. Anschließend erfolgte eine Filtration über Laborfilterpapier)

- Toluidinblau nach Kiel (100ml):

- 1 g Toluidinblau
- 1 g Natrium-Tetraborat
- 100 ml destilliertes Wasser

Alle Substanzen wurden miteinander vermischt und filtriert.

Für die nachfolgenden Färbeschritte fand das unten aufgeführte Schema Anwendung:

- Waschung der Präparate in destilliertem Wasser für 5 Minuten
- Einlegen in H₂O₂ für 10 Minuten
- Spülen unter Leitungswasser für 1 Minute
- Inkubation mit 4 %iger Ameisensäure für 30 Sekunden
- Spülen unter Leitungswasser für 1 Minute
- Einlegen in 0,1 %iger Toluidinblau-Lösung nach Kiel für 1 Minute
- Spülen unter Leitungswasser für 1 Minute
- Einlegen in 0,01 %iger Toluidinblau-Lösung nach Donath für 1 Minute
- Spülen unter Leitungswasser für 1 Minute

- Trocknen lassen für mindestens 12 Stunden
- Eindecken mit DePex
- Aufbringen von Deckgläschen

2.6.6 Auswertung mittels Mankin-Score

Vor der Auswertung wurde auch in diesem Schritt jedes Präparat mit Hilfe der *CCD*-Kamera in Verbindung mit dem binokulären Lichtmikroskop und der entsprechenden Verarbeitungssoftware dokumentiert. Zur genaueren Quantifizierung wurde jede Subregion (A, B, C) des jeweiligen Präparates histologisch untersucht. Hierzu wurde das modifizierte Graduierungssystem nach Mankin verwendet [77], welches sich der Beurteilung von Knorpelstruktur, Beschaffenheit der Chondrozyten und der Intensität der Toluidinblaufärbung bedient (siehe folgende Tabelle).

Kriterium	Score	Kennzeichen
Knorpelstruktur	0	normale Struktur
	1	Oberflächenunregelmäßigkeiten
	2	Pannus und Oberflächenunregelmäßigkeiten
	3	Risse in der Übergangszone
	4	Risse in der tiefen Zone
	5	Risse in der kalzifizierten Zone
Chondrozyten	0	normale Konfiguration
	1	diffuse Hyperzellularität
	2	Zellklone
	3	Hypozellularität
Toluidinfärbung	0	normale Anfärbung
	1	leicht reduzierte Anfärbung
	2	mäßig reduzierte Anfärbung
	3	stark reduzierte Anfärbung
	4	keine Anfärbung
	5	totale Desorganisation
Tidemark	0	intakt
	1	von Gefäßen durchbrochen

Tabelle 3: **Graduierungskriterien nach Mankin [77]**

Die Beurteilung erfolgte durch zwei voneinander unabhängig agierende Untersucher; die Ergebnisse wurden im Anschluss gemittelt.

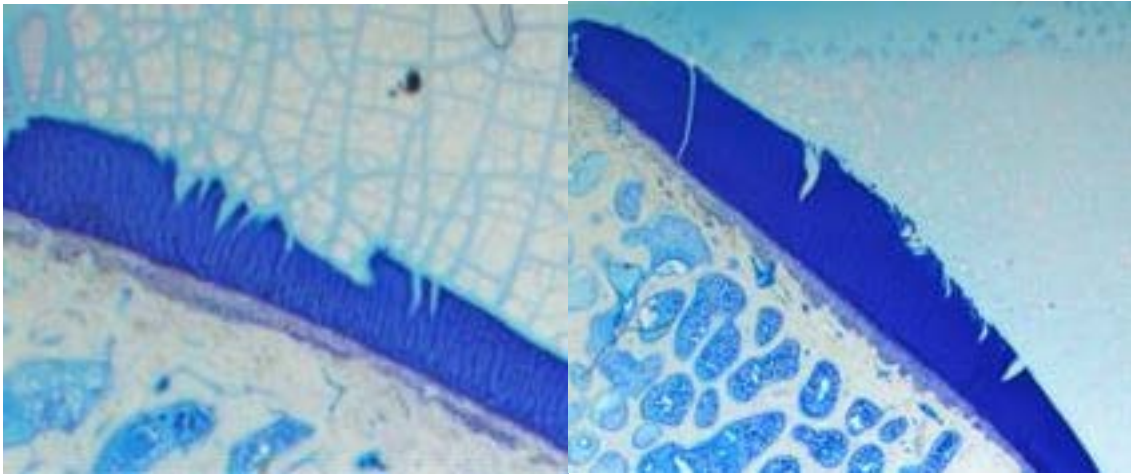


Abb. 16: **Beispiele histologischer Schnitte mit Mankin-Score 4 (Risse tangential + reduzierte Anfärbarkeit)**

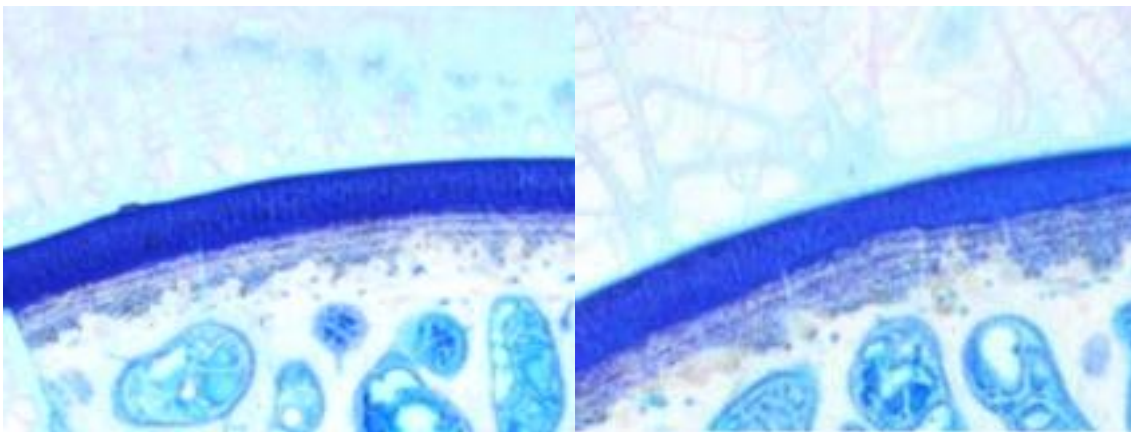


Abb. 17: **Beispiele histologischer Schnitte mit Mankin-Score 1 (reduzierte Anfärbarkeit)**

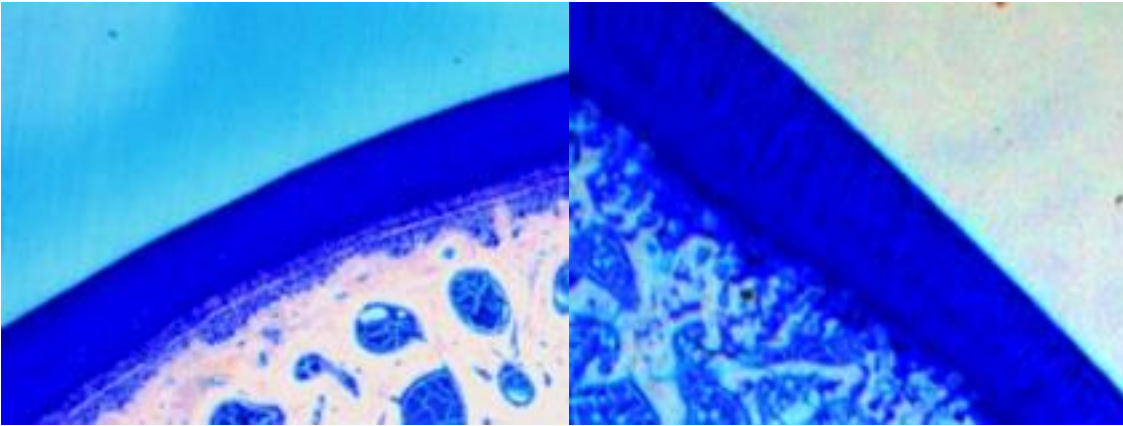


Abb.18: **Beispiel eines histologischen Schnittes mit Mankin-Score 0**

3. Ergebnisse

3.1 Erklärung

Für die Erhebung der nachfolgenden Ergebnisse wurde ein Kollektiv von 20 Hüftkopfpräparaten untersucht, welches von weiblichen Exemplaren der Gattung *Ovis aries* stammt. Anteile der Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht (siehe Auflistung der Publikationen).

3.2 Auswertungen der Histologie mittels Toluidinblaufärbung

Es wurden insgesamt 303 Subregionen histologischer Präparate mittels Toluidinfärbung und anschließender Auswertung anhand des Mankin-Scores untersucht, von diesen mussten 6 als nicht beurteilbar klassifiziert werden. Dies geschah wegen einer ungenügenden und unregelmäßigen Anfärbung, somit ein Umstand, welcher deutlich als Färbefehler zu klassifizieren war oder wegen einer zu hochgradigen Schädigung der histologischen Knorpelstruktur, welche nicht auf degenerative Erscheinungen zurückzuführen war (Schädigung bei der Proben-gewinnung und Verarbeitung). Alle nicht zu beurteilenden Bereiche stammen aus der Population der erwachsenen Schafe. Somit wurden in der Gesamtzahl 297 Subregionen histologisch aufgearbeitet. Hiervon entfielen 150 auf die Gruppe der Lämmer und 147 auf die Gruppe der Schafe.

Zur Auswertung wurde der modifizierte Mankin-Score, wie im Abschnitt 2.6.6 beschrieben, herangezogen.

Hierbei zeigten sich weitestgehend intakte Knorpelstrukturen in der Population der Lämmer, lediglich bei 3 Subregionen fand sich ein Mankin-Score von 2, dies entspricht 3 % der Gesamtuntersuchungen; höhere Scores traten in dieser Gruppe gar nicht auf. Hauptursächlich für Abweichungen von der Norm waren in 66 % der Untersuchungen Veränderungen der Knorpeloberfläche. Lediglich bei 2 % der Untersuchungen fanden sich Defizite in der Anfärbbarkeit.

Hingegen fielen bei der Population der Schafe deutlich höhergradige Schädigungen der Knorpelstruktur auf. In insgesamt 24 untersuchten Subregionen fand sich ein Mankin-Score von 2 oder mehr, dies entspricht 16 % der Gesamtuntersuchungen. Hiervon erschienen 10 Subregionen mit einem Score von 4 und 6 Subregionen mit einem Score von 5. Dies entspricht jeweils 7 %, beziehungsweise 4 % der Gesamtuntersuchungen. Hauptursächlich für Veränderungen waren in 20 % der Untersuchungen strukturelle Schäden der Knorpeloberfläche. In 23 % aller Untersuchungen der Versuchsgruppe Schaf fand sich eine Verminderung der Anfärbbarkeit durch Toluidinblau. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

		Gruppe I (Lamm)	Gruppe II (Schaf)
Mankin Struktur	0	51 (34 %)	108 (80 %)
	1	99 (66 %)	10 (7 %)
	2	-	-
	3	-	11 (8 %)
	4	-	8 (5 %)
Mankin Toluidin	0	147 (98 %)	112 (77 %)
	1	3 (2 %)	34 (23 %)
Mankin Gesamt	0	51 (34 %)	101 (69 %)
	1	96 (64 %)	22 (15 %)
	2	3 (2 %)	5 (3 %)
	3	-	3 (2 %)
	4	-	10 (7 %)
	5	-	6 (4 %)

Tabelle 4: **Resultate der Scores für Struktur, Toluidin-Färbung und Mankin-Gesamtwert in den beiden Altersgruppen**

Folgende grafische Darstellungen verdeutlichen die Resultate:

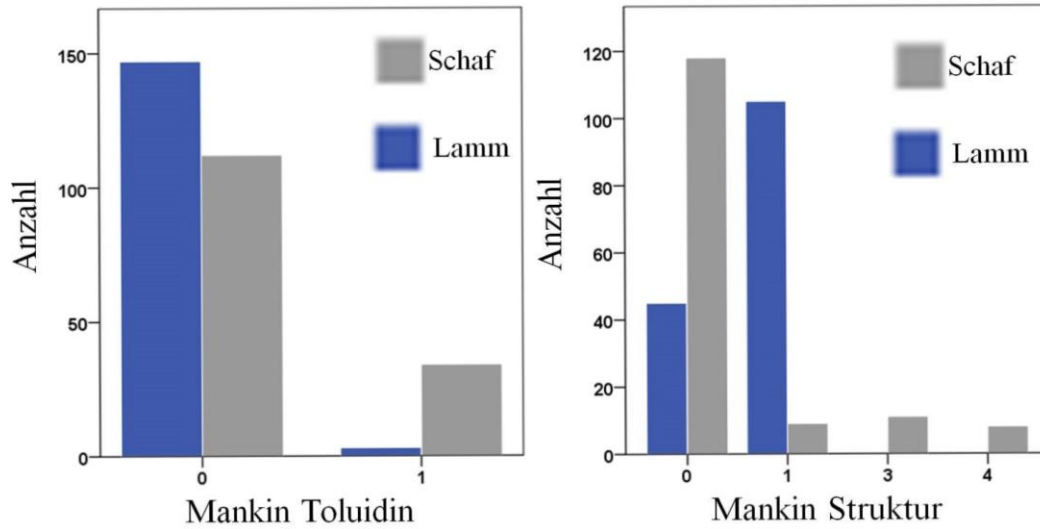


Abb. 19: Verteilung der Mankin-Scores für Färbung und Struktur in den beiden Versuchsgruppen

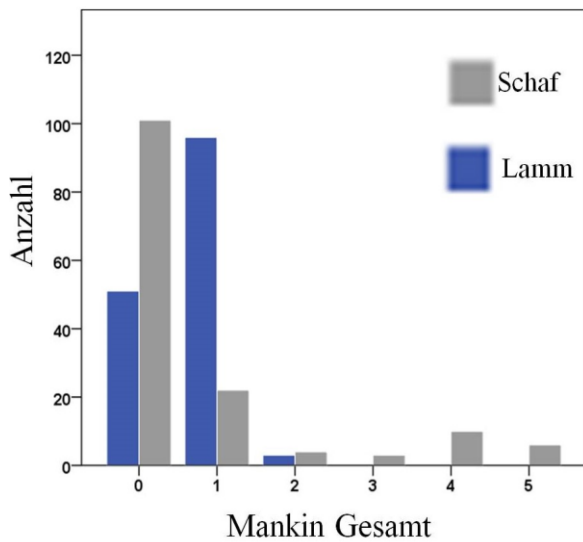


Abb. 20: Verteilung der Mankin-Scores „Gesamt“ in den beiden Versuchsgruppen

3.3 Auswertungen der T1_{Gd}-Zeiten

Analog zu der histologischen Untersuchung standen 303 Subregionen und somit 303 daraus zu generierende *ROIs* für die Auswertung zur Verfügung (101 MRT-Reformate der histologischen Schnitte mit jeweils 3 Subregionen). Die durchschnittliche Größe der *ROIs* betrug $0,036 \pm 0,12 \text{ cm}^2$ (Spannbreite: $0,01 \text{ cm}^2 - 0,2 \text{ cm}^2$). Hierbei mussten 26 *ROIs* von der Analyse ausgeschlossen werden. Grund hierfür waren eine zu schlechte qualitative Darstellung des MRT-Bildes sowie zu hochgradige Knorpelschädigungen im zu untersuchenden Bereich (Outerbridge nach Uhl > 1). Somit wurden insgesamt 277 *ROIs* weiterführend untersucht. Hiervon entfielen 144 auf die Gruppe der Lämmer und 133 auf die Gruppe der Schafe.

Es zeigte sich, dass die T1_{Gd}-Zeiten in der Gruppe der Lämmer signifikant höher waren als die T1_{Gd}-Zeiten in der Gruppe der Schafe. Der *Mean*-Wert der T1_{Gd}-Zeiten von 623,6 ms stand hier dem *Mean*-Wert von 540,4 ms in der Schafsgruppe gegenüber. Der p - Wert lag bei < 0.001 .

Die folgende Tabelle verdeutlicht die Werte:

	T1 _{Gd} Gruppe I (Lamm) (ms)	T1 _{Gd} Gruppe II (Schaf) (ms)
Durchschnitt	623.6	540.4
Minimum	454.6	360.2
Maximum	798.6	884.8
Standardabweichung	72.8	92.9

Tabelle 5: **Mean-Werte, Spannweite und Standardabweichungen der T1_{Gd}-Zeiten in beiden Vergleichsgruppen**

Das folgende Boxplot-Diagramm verdeutlicht den statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen:

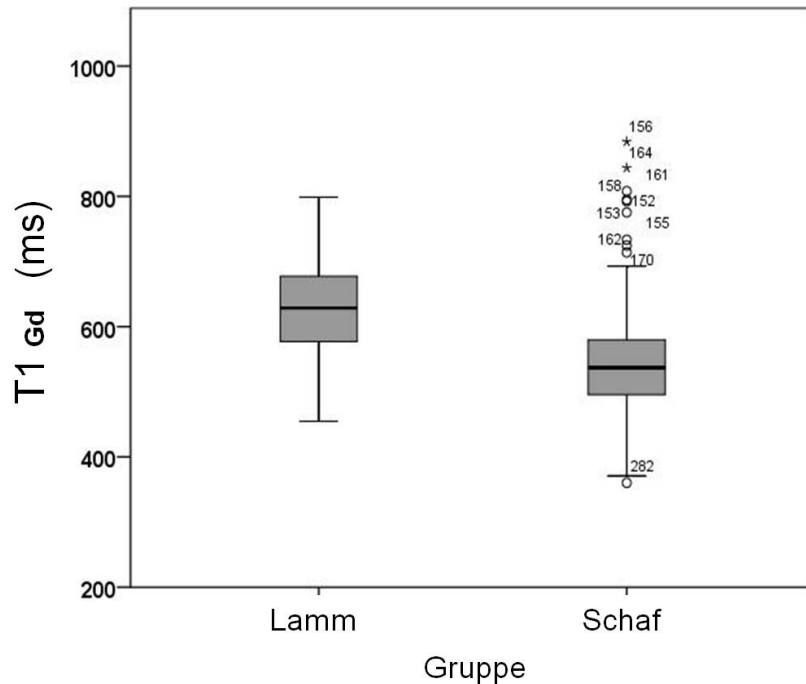


Abb. 21: **Boxplot-Diagramm mit Darstellung des statistisch signifikanten Unterschiedes zwischen beiden Gruppen mit T1_{Gd}-Min-Wert, unterem Quartil, T1_{Gd}-Median, oberem Quartil, T1_{Gd}-Max-Wert und Ausreißern**

3.4 Auswertungen der Histologie mittels immunhistologischer Färbung

Insgesamt wurden kongruent zur Anzahl der mittels Färbung mit Toluidinblau untersuchten Schnitte insgesamt 303 Subregionen mittels der Immunhistochemie gefärbt und beurteilt. Hierbei zeigten sich gravierende Unterschiede in der Intensität der Anfärbung auch innerhalb des gleichen Präparates, teilweise auch im Vergleich zwischen benachbarten histologischen Schnitten. Mikroskopisch fanden sich darüber hinaus keine Unterschiede in Form von strukturellen Defiziten oder bei der Verteilung der Chondrozyten. Da sich zudem die Abweichungen in der Immunhistologischen Anfärbbarkeit nicht in den deckungsgleichen Subregionen der Toluidinblau-Präparate wiederfinden war somit von einem biochemischen Färbefehler auszugehen.

Es wurden daraufhin zwei weitere Versuche nach demselben Procedere unter strikter Vermeidung von gegebenenfalls störenden Temperatureinflüssen vorgenommen; auch hier kam es zum selben Phänomen unterschiedlicher Anfärbbarkeit.

Folgende Beispielbilder zeigen die Unterschiede:

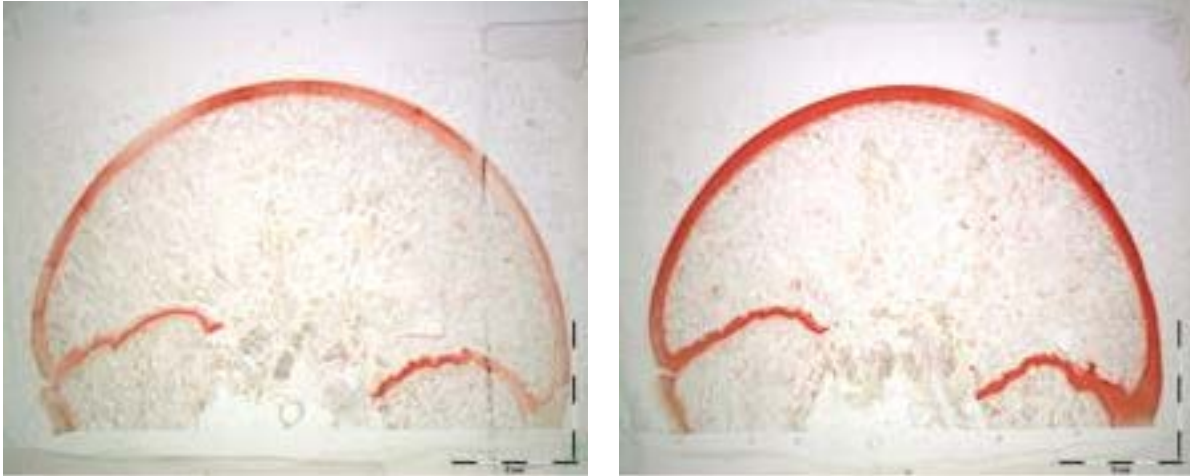


Abb. 22: **Aufeinander folgende Schnitte am Präparat Lamm 5, immunhistologisch gefärbt**



Abb. 23: **Aufeinander folgende Schnitte am Präparat Schaf 7, immunhistologisch gefärbt**

Da die Ergebnisse der immunhistologischen Färbung somit nicht als valide bezüglich einer Beurteilbarkeit der tatsächlichen histologischen Beschaffenheit des zu untersuchenden Knorpels bezeichnet werden konnten, fanden sie keinen Eingang in die weitere Auswertung. Es fand kein Abgleich mit den anderen Untersuchungen statt.

4. Diskussion

4.1 Allgemeines

Wie im Kapitel 1.1.3 dargelegt, hat die Prävalenz degenerativer Knorpelerkrankungen, bezogen auf die westlichen Industrienationen, in den letzten Jahrzehnten stetig zugenommen. Die Kosten für Diagnostik, Therapie und Rehabilitation sind darüber hinaus im bedeutenden Maße gestiegen und stellen für das Gesundheitssystem eine zunehmende Belastung dar [10, 58]. Den Schwerpunkt der ärztlichen Behandlung auf eine möglichst frühzeitige Diagnostik und entsprechend gezielte Intervention und Prävention zu legen, erscheint daher sinnvoll und zielführend.

Somit könnten moderne MRT-Techniken, welche als besonders sensitiv für strukturelle und histologische Veränderungen vor allem des Gelenkknorpels anzusehen sind, neue diagnostische Perspektiven eröffnen.

Seit Beginn der 2000er Jahre konnte bereits in zahlreichen Studien, vor allem in vivo, der Nutzen des *dGEMRIC*-Verfahrens zur Graduierung von bestehenden degenerativen oder traumatischen Knorpelveränderungen im Vergleich zu etablierten Methoden wie zum Beispiel röntgenologischen *Scores* oder nicht-quantitativen MRT-Verfahren belegt werden [60 - 62]. Bittersohl et al. konnten zudem aufzeigen, dass die *dGEMRIC*-Technik in ihrer Sensitivität gegenüber anderen modernen und biochemisch sensitiven MRT-Verfahren bei bestimmten Knorpelerkrankungen wie dem femoroazetabulären Impingement (FAI) überlegen erscheint [81]. Ein ähnliches Resultat zur FAI fand sich bei Jessel, Zilkens et al., welche die T1_{Gd}-Werte bei 37 symptomatischen Patienten mit klinischen Parametern und dem Grad der Deformität korrelieren konnten [82]. Auch bei angeborenen Ursachen der sekundären Arthrose konnte das Verfahren erfolgreiche Anwendung finden, so gezeigt zum Beispiel in einer Studie, welche frühe Veränderungen im medialen Gelenkknorpel-Kompartiment des Hüftkopfes bei

Patienten mit Morbus Perthes detektieren konnte [83]. Kim, Jaramillo et al. wiederum konnten nachweisen, dass der *dGEMRIC*-Index mit der Schmerzskala und dem radiologischen Schweregrad bei verschiedenen Probandengruppen mit Hüftdysplasie korrelierte; die Gelenkspaltweite als gängiger radiologischer Parameter jedoch keine Übereinstimmung mit der Schwere der Dysplasie zeigte [84]. Ein intensiv beforschtes Gebiet stellen die verschiedenen operativen Knorpel regenerierenden Verfahren dar, welche in ihrem postoperativen Verlauf mittels *dGEMRIC* sehr valide und differenziert beurteilt werden können [85-87]. So konnte zum Beispiel 2008 an einem Kollektiv von 20 Patienten mittels der *dGEMRIC*-Technik gezeigt werden, dass ein relevanter Vorteil in der Knorpelqualität des Regenerates bei Matrix-assoziiierter Chondrozyten-Transplantation gegenüber der Mikrofrakturierung besteht; zudem wurde aufgezeigt, dass gängige klinische *Scores* nicht in der Lage waren, diesen Unterschied zu detektieren [86]. Weitere vergleichende Studien bzgl. dieser oder verwandter Verfahren kamen zu ähnlichen Ergebnissen [88, 89].

Es könnte demnach möglich sein, zukünftig bereits bei frühen biochemischen Substanzdefiziten im hyalinen Gelenkknorpel ohne Vorliegen einer relevanten klinischen Symptomatik den möglichen Progress einer für den Knorpel schädlichen Pathologie abzuschätzen. Somit könnten die Verfahren als Indikator für eine frühe therapeutische Intervention genutzt werden. Da der Erfolg von präventiven operativen Therapien maßgeblich von der gegebenen Knorpelqualität limitiert wird, läge hier ein deutlicher prognostischer Vorteil auf der Hand. So konnten zum Beispiel bereits 2006 Cunningham et al. anhand präoperativer *dGEMRIC*-Bildgebung das *Outcome* von Patienten mit Hüftdysplasie prognostizieren, welche sich einer periazetabulären Osteotomie unterzogen. Hierbei konnte in einer Kohorte von 47 Patienten aufgezeigt werden, dass die präoperativen T1_{Gd}-Werte die höchste Übereinstimmung mit der Rate an Misserfolgen der Therapie aufwiesen und den prognostischen röntgenologischen Kriterien überlegen waren [90]. Owman, Tiderius et al. konnten 2008 anhand des röntgenologischen *Follow-Up* von verschiedenen Patienten, welche 6 Jahre zuvor arthroskopisch und mittels *dGEMRIC* evaluiert wurden, nachweisen, dass die niedrigsten T1_{Gd}-Werte mit den höchstgradigen Arthrosezeichen im Röntgenbild einhergingen [91].

Auch konservative Maßnahmen wurden untersucht, so konnten zum Beispiel Roos et Dahlberg 2005 in ihrer Studie zeigen, dass ein moderates Trainingsprogramm einige

Jahre nach einer partiellen Meniskektomie zu einer deutlichen Verbesserung der durch *dGEMRIC* am Kniegelenk ermittelten $T1_{Gd}$ -Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe führte [92].

Zusammengefasst wären durch die neuen Technologien vermehrt kurative Therapieansätze möglich. Darüber hinaus dürften sie zukünftig bei bereits diagnostizierten degenerativen Erkrankungen als Parameter der Verlaufs- und Therapiekontrolle sowie zum Abschätzen von Indikationen eines Therapiewechsels von entscheidender Bedeutung sein [93, 94].

Allerdings liegen bislang wenig Erkenntnisse zu Methoden der qualitativen Messung der Knorpelsubstanz bei klinisch und bildmorphologisch gesundem Gelenkknorpel in verschiedenen Alters- oder Belastungsgruppen vor. Bisherige Studien fokussierten sich hierbei eher auf alternative Methoden wie das *T2-Mapping* von Kollagenen und konnten messbare Unterschiede in Proben verschiedener Altersgruppen von gesunden Probanden nachweisen. So konnten Goebel, Watrin-Pinzano et al. im Patellarknorpel älterer knorpelgesunder Probanden (bis 65 Jahren) erhöhte T2-Relaxationszeiten als Zeichen einer Kollagendegeneration gegenüber den jüngeren Studienteilnehmern (ab 18 Jahren) erkennen. Zeitgleich zeigte sich in den Gruppen kein relevanter Unterschied im Knorpelvolumen [95]. Somit ist davon auszugehen, dass auch in Abwesenheit einer klinisch manifesten Arthrose histologisch-strukturelle Veränderungen im Gelenkknorpel vorliegen können. Mehrere aktuelle Arbeiten konnten herausstellen, dass auch das *dGEMRIC*-Verfahren Hinweise auf morphologisch nicht sichtbare Veränderungen des Gelenkknorpels bei Gesunden zu liefern vermag: Kurkijärvi et al. wiesen in gesunden Kniegelenken topografische Unterschiede anhand der $T1_{Gd}$ -Zeiten nach, welche sich in anderen Parametern der Knorpelqualität, wie zum Beispiel der Knorpelsteifigkeit, nicht widerspiegelten [96]. In einer weiteren Studie, veröffentlicht von Anandacoomarasamy et al. wurden *dGEMRIC*-Untersuchungen bei Kniegelenken von Probanden aus Adipositasprogrammen durchgeführt. Hier war eine Korrelation sinkender $T1_{Gd}$ -Zeiten mit dem Alter zu eruieren. Allerdings ist zu erwähnen, dass hier nicht alle Patienten frei von Arthrose waren (lediglich ca. 70 %). Eine Korrelation mit dem BMI fand sich nicht [97]. Tiderius, Svensson et al. beforchten die GAG-Veränderungen nach sportlicher Belastung, stellten hierbei aber keine Staffelung nach Altersgruppen auf [27].

Insgesamt ist festzustellen, dass eine Korrelation der MRT-Resultate mit

Veränderungen auf biochemischer Ebene durch histologische Aufarbeitung bislang nicht in umfangreichem Maße erfolgt ist. Auch Trattinig et al. erkannten 2008, welchen Stellenwert die biochemisch sensitiven MRT-Verfahren in der diagnostischen und post-interventionellen klinischen Anwendung finden könnten, sobald eine bessere Studienlage zur Kongruenz mit der Histopathologie vorliegen würde [98]. Zuletzt zeigten Juras et al. 2008 in einer Studie an menschlichen Knorpelproben die Validität der *dGEMRIC*-Technik durch Korrelation mit der histologischen Aufarbeitung. Allerdings kamen hier Proben aus Resektaten nach totalem Gelenkersatz zur Anwendung [46], so dass der Aspekt der Detektion von Veränderungen beim Knorpelgesunden nicht im Vordergrund stand.

Somit war das vornehmliche Ziel der vorliegenden Studie, einen Vergleich von Hüftknorpelproben aus zwei verschiedenen Altersgruppen ohne zugrundeliegende makroskopische präarthrotische Veränderungen mit den Ergebnissen der hochauflösendem MRT-Verfahren (*dGEMRIC*-Verfahren) und der Histologie herbeizuführen. Es ließ sich folgende Arbeitshypothese dieser Studie formulieren: Degenerativ bedingte Frühveränderungen des Gelenkknorpels lassen sich anhand des *dGEMRIC*-Verfahrens auch in Abwesenheit gravierender Knorpelschäden darstellen.

4.2 Die Wahl des Tiermodells

Wie bereits im Kapitel 1.4 dargelegt, finden Tiermodelle häufig Anwendung in der orthopädischen Forschung. Neben Schweinen und Ratten [99, 100, 101] sind insbesondere Schafe gebräuchliche Tiermodelle für die Untersuchung von Diagnostika zur Knorpelregeneration und -degeneration sowie zur Verlaufsbeurteilung verschiedener interventioneller Therapieformen von Knorpelschäden, unter anderem auch der Arthrose [67, 68, 69, 76, 102].

In der vorliegenden Studie wurde zudem das Schaf als Tiermodell genutzt, da eine ausreichend hohe Anzahl an Knorpelproben verschiedener Altersgruppen in ausreichender Anzahl und ohne viel Aufwand verfügbar war. Zudem war aufgrund des Kaufs von Schafen aus einem einzigen Bestand von einer standardisierten und vergleichbaren Aufzuchtsituation auszugehen.

Bei der Untersuchung zeigten sich $T1_{Gd}$ -Zeiten im *Mean* von $623,6 \pm 72,8$ ms in der Gruppe der Lämmer im Vergleich zu Werten im *Mean* von $540,4 \pm 92,9$ ms in der

Gruppe der Schafe. Angesichts der Tatsache, dass diese Zahlen vergleichbar sind mit erhobenen Werten von gesundem Hüftgelenkknorpel beim Menschen aus anderen *dGEMRIC*-assoziierten Studien [84, 87, 103], wird die Validität des Schafsmodells und dessen Wert für die orthopädische Forschung hier erneut bestätigt.

Als Einschränkung muss jedoch klar herausgestellt werden, dass trotz der gängigen Nutzung des Modells Schaf in der Forschung folgende Unterschiede nur eine bedingte Korrelation mit den Verhältnissen im menschlichen Knorpel erlauben:

1. Der Mensch als einzige Säugetierspezies mit dauerhaftem aufrechtem Gangbild kann kein Tiermodell mit adäquat vergleichbaren Belastungs- und Degenerations-eigenschaften finden [64, 104].

2. Voruntersuchungen konnten trotz der strukturellen Übereinstimmungen mit dem Schafsmodell auch gravierende histologisch-biochemische Unterschiede zum Beispiel bei der Expression der GAG und Kollagene sowie bei der Morphologie der Chondrozyten und deren Differenzierungsfähigkeit herausstellen [105].

Es muss daher bei der Bewertung der hier vorliegenden Daten eine zumindest eingeschränkte Übertragbarkeit auf humananatomische Verhältnisse beachtet werden.

4.3 Ergebnisse der T1_{Gd}-Zeiten

Zusammengefasst konnten in einigen Hüftköpfen aus der Gruppe der erwachsenen Schafe (Gruppe II) entweder makroskopisch sichtbare oder in der Strukturanalyse nach Mankin auffällige arthrotische Veränderungen dargestellt werden. Insgesamt 98 % der *ROIs* in Gruppe I zeigten ein normales Toluidin-Färbemuster als Indikator für eine physiologische GAG-Verteilung innerhalb des Gelenkknorpels. Im Vergleich dazu zeigten in Gruppe II nur 73 % der *ROIs* ein entsprechend regelrechtes GAG-Färbemuster auf. Somit kann in den verbliebenen 27 % der *ROIs* ein verminderter GAG-Gehalt postuliert werden. Es ließ sich also zunächst auf histologischer Ebene der vermutete altersabhängige Unterschied in der Knorpelqualität auch in Abwesenheit sichtbarer Substanzdefizite nachweisen.

Bezüglich der Auswertung der *dGEMRIC*-Resultate bestand zudem ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) hinsichtlich der T1_{Gd}-Zeiten der beiden

Studiengruppen ($T1_{Gd} = 623,6$ ms in Gruppe I und $540,4$ ms in Gruppe II). Dies entspricht einer Reduktion in Gruppe II im Vergleich zur Gruppe I von $83,2$ ms und somit von $13,3$ %.

Folglich erkennt man eine direkte negative Korrelation zwischen den ermittelten Mankin-Scores und den $T1_{Gd}$ -Zeiten in beiden Versuchsgruppen. Es ist somit festzuhalten, dass das *dGEMRIC*-Verfahren als sensitive Methode zur Beurteilung des klinisch und bildmorphologisch gesunden Gelenkknorpels geeignet erscheint. Zudem konnte der vermutete quantitative und somit auch qualitative Unterschied im Knorpelaufbau von Individuen verschiedener Altersgruppen nachgewiesen werden.

4.4 Einflussfaktoren

Die vorliegende Studie hat bestimmte Limitierungen. Zum einen sind hier als systembedingte Verzerrung die bereits in 4.2 beschriebenen Eigenheiten des Schafsknorpels in der Modellfunktion für humanes Knorpelgewebe zu nennen. Zudem wurden die benötigten Hüftköpfe von Tieren entnommen, welche unter nicht-kontrollierten Bedingungen auf der Weide gelebt haben und zum Verzehr geschlachtet wurden. Kenntnisse über äußere Belastungsfaktoren oder den Bewegungsumfang der Tiere liegen somit nicht vor. Auch die Schwankungsbreite in der Altersstruktur innerhalb der Versuchsgruppen von bis zu 6 Monaten sollte als Einflussfaktor berücksichtigt werden.

Zur Markierung der gemessenen *ROIs* diente bioresorbierbares Nahtmaterial; zusätzlich wurden anatomische Besonderheiten („*landmarks*“) als Markierung für die anschließende 3D-multiplanar-Reformatierung verwendet. Es ist somit möglich, dass die histologischen Schnittbilder und die korrespondierenden MRT-Bilder aus den folgenden Gründen nicht vollständig übereinstimmen:

1. Wegen einer möglichen Ungenauigkeit bei der Korrelation zwischen histologischer und MRT-Schnittführung beziehungsweise wegen leichter Abweichungen der Schnittwinkel.
2. Wegen Unterschieden in der Bildauflösung zwischen den beiden Modalitäten.

Insgesamt ist jedoch durch die durchgeführten Untersuchungen nach dem Zwei-

Augen-Prinzip von einer eher zu vernachlässigenden Abweichung auszugehen. Mehrere Studien konnten bereits die Verlässlichkeit der Ergebnisse durch die *dGEMRIC*-Bildgebung unter Anwendung verschiedener Verfahren der Gewebefixierung belegen, zum Beispiel der allgemein üblichen Formaldehyd-Fixierung [106], welche auch in dieser Studie zur Anwendung kam. Zusätzlich wurde aus technischen Gründen eine aufwändige Kunstharzeinbettung der Präparate (Technovit-System) verwendet. Es existiert jedoch bislang keine Studienlage zu biochemischen Veränderungen der Proteoglykane durch diese Art von Fixierung oder mögliche Einflüsse des Signalverhaltens auf die $T1_{Gd}$ -Zeiten.

5. Zusammenfassung:

Die dieser Arbeit zu Grunde liegende Arbeitshypothese wurde bestätigt, eine altersbedingte Veränderung des hyalinen Gelenkknorpels konnte unabhängig von degenerativer Knorpelschädigung nachgewiesen werden. Es ist somit auch bei klinisch gesunden Säugetieren von einer belastungs- oder lebensstilabhängigen Degradation der GAG-Zusammensetzung des Gelenkknorpels auszugehen. Das *dGEMRIC*-Verfahren hat sich zudem als reliabel zur Detektion dieser Veränderungen erwiesen, da es die Unterschiede in den verschiedenen Altersgruppen aufzeigen und in ihren Resultaten durch die histologische Auswertung der analogen Schnittbilder validiert werden konnte. Das *dGEMRIC*-Verfahren wäre somit vermutlich auch im klinischen Bereich als ein guter Parameter bei der Beurteilung von Frühveränderungen des Knorpels im Rahmen der Knorpeldegeneration anzusehen.

Es ist jedoch trotz der gewonnenen Erkenntnisse notwendig, weitere kontrollierte Studien durchzuführen, um die hier beschriebenen vorläufigen Ergebnisse zu bestätigen. Zunächst könnte ein Abgleich von histologischen Schnittbildern aus identischen Proben humanen oder tierischen Ursprungs erfolgen, welche nach herkömmlichen Methoden und mittels Kunstharzeinbettung fixiert wurden, sowie die Korrelation der Resultate mit korrespondierenden *dGEMRIC*-Schnittaufnahmen und $T1_{Gd}$ -Zeiten, um etwaige Unterschiede zu detektieren.

Darüber hinaus ist die Übertragung unseres Versuchsaufbaus auf menschliche

Knorpelpräparate unerlässlich. Entsprechende Studien mit Präparaten freiwilliger Spender, generiert aus Patienten, welche sich der operativen Versorgung mit endoprothetischem Gelenkersatz unterzogen, wurden parallel zu dieser Studie durchgeführt [78]. Auch hier konnte eine statistisch signifikante Korrelation zwischen den T1_{Gd}-Zeiten und den erhobenen Mankin-Scores herausgestellt werden. Um eine Fortsetzung der Untersuchung klinisch gesunden Knorpelgewebes und weitere Erkenntnisse über präarthrotische Veränderungen der Knorpelanatomie zu ermöglichen, wäre zudem eine Untersuchung an Körperspendern denkbar.

Langfristig erscheint es notwendig die erkannten Unterschiede in der Knorpelstruktur für die verschiedenen Altersgruppen aufzuarbeiten und alterstypische Normwertbereiche zu etablieren. Nur so kann gewährleistet werden, dass in folgenden Kohortenstudien mit gesunden Kontrollgruppen der Faktor „Alter“ die notwendige Berücksichtigung bei der Auswertung der Resultate erfährt und systembedingte Verfälschungen vermieden werden.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Anderson JJ, Felson DT. Factors associated with osteoarthritis of the knee in the First National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES I): Evidence for an association with overweight, race and physical demands of work. *American Journal of Epidemiology*. **1988**;128:179-189.
- [2] Felson DT, Naimark A, Anderson J, Kazis L, Catelli W, Meenan RF. The prevalence of knee osteoarthritis in elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis and Rheumatism*. **1987**;30:914-918.
- [3] Imhof H, Nöbauer-Huhmann I, Trattig S. Koxarthrose, ein Update. *Radiologe*. **2009**;49:400–409. Published online: DOI 10.1007/s00117-009-1832-0.
- [4] Gerber E, Prim J, Michel BA. *Sonographie des Bewegungsapparates*. Stuttgart:Thieme; **2000**.
- [5] Imhof H, Nöbauer-Huhmann IM, Krestan C, Gahleitner, Sulzbacher I, Marlovits S, Trattig S. MRI of the cartilage. *European Radiology*. **2002**;12:2781-2793.
- [6] Millis MB, Kim YJ. Rationale of osteotomy and related procedures for hip preservation: a review. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. **2002**;405:108-121.
- [7] Kim YJ, Ganz R, Murphy SB, Buly RL, Millis MB. Hip joint-preserving surgery: beyond the classic osteotomy. *Instructional Course Lectures*. **2006**;55:145-158.
- [8] Neogi T, Booth SL, Zhang YQ, Jacques PF, Terkeltaub R, Aliabadi P, Felson DT. Low vitamin K status is associated with osteoarthritis in the hand and knee. *Arthritis and Rheumatism*. **2006**;54:1255-1261.
- [9] Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft. Handlungsleitlinie Degenerative Gelenkerkrankungen, aus: Empfehlungen zur Therapie von degenerativen Gelenkerkrankungen. *Arzneiverordnung in der Praxis/Sonderheft*; **2008**.
- [10] Engelhardt M. Epidemiologie der Arthrose in Westeuropa. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*. **2003**;54:171-175.
- [11] Theiler R. Arthrose: Epidemiologie, Diagnose und Differentialdiagnose, Abklärung und Dokumentation. *Schweizer Medizin Forum*. **2002**;53:555-561.
- [12] Population Division of the Department of Economic and Social Affairs of the United Nations

Secretariat. World population 1950 – 2050 (the 1998 revision). *POP/DB/WPP/Rev. UN.1999*. Data set in digital form.

[13] Hamerman D. The biology of osteoarthritis. *New England Journal of Medicine*. **1989**;320:1322-1330.

[14] Karachios TR, Karantanas AH, Malizios K. Hip osteoarthritis: what the radiologist wants to know. *European Journal of Radiology*. **2007**;63:36-48.

[15] Outerbridge RE. The etiology of chondromalacia patellae. *Journal of Bone and Joint Surgery*. **1961**;43-B (4):752-754.

[16] Imhof H. Arthrose (Degenerative Gelenkserkrankungen), In: Freyschmidt J, ed. *Handbuch diagnostische Radiologie, muskuloskelettales System*. Berlin Heidelberg New York: Springer; **2005**.

[17] Evidence Development and Standards Branch, Health Quality Ontario. Arthroscopic lavage and debridement for osteoarthritis of the knee. *Ontario Health Technology Assessment Series*. **2005**;5(12):1-37.

[18] Trattinig S, Mlynarik V, Huber M, Ba-Ssalamah A, Puig S, Imhof H. Magnet resonance imaging of articular cartilage and evaluation of cartilage disease. *Investigative Radiology*. **2000**;35:595-601.

[19] Eckstein F, Burstein D, Link T. Quantitative MRI of cartilage and bone: degenerative changes in osteoarthritis. *NMR in Biomedicine* **2006**;19:822–854. Published online in *Wiley InterScience* (www.inter-science.wiley.com): DOI:10.1002/nbm.1063.

[20] Zilkens C, Miese F, Jäger M, Bittersohl B, Krauspe R. Magnetic resonance imaging of hip joint cartilage and labrum. *Orthopedic Reviews*. **2011**;3:9.

[21] Zilkens C, Jäger M, Bittersohl B, Dudda M, Millis MB, Kim YJ, Muhr G, Krauspe R, Mamisch TC. Delayed Gadolinium Enhanced MRI of Cartilage (dGEMRIC). *Orthopäde*. **2009**. Published online: DOI 10.1007/s00132-009-1441-7.

[22] Nishii T, Nakanishi K, Sugano N, Masuhara K, Ohzono K, Ochi T. Articular cartilage evaluation in osteoarthritis of the hip with MR imaging under continuous leg traction. *Magnetic Resonance Imaging*. **1998**;16:871-875.

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

- [24] Schmid MR, Noetzi HP, Zanetti M, Wyss TF, Hodler J. Cartilage lesions in the hip: diagnostic effectiveness of MR arthrography. *Radiology*. **2003**;226(2):382-386.
- [25] Calvo E, Palacios I, Delgado E, Ruiz-Cabello J, Hernandez P, Sanchez-Pernaute O, Egido J, Herrero-Beaumont G. High-resolution MRI detects cartilage swelling at the early stages of experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. **2001**;9:463-472.
- [26] Bashir A, Gray ML, Boutin RD, Burstein D. Glycosaminoglycan in articular cartilage: in vivo assessment with delayed Gd(DTPA²⁻)-enhanced MR imaging. *Radiology*. **1997**;205(2):551-558. Published online: DOI [10.1148/radiology.205.2.9356644](https://doi.org/10.1148/radiology.205.2.9356644).
- [27] Tiderius CJ, Svensson J, Leander P, Ola T, Dahlberg L. dGEMRIC (Delayed Gadolinium-Enhanced MRI of Cartilage) indicates adaptive capacity of human knee cartilage. *Magnetic Resonance in Medicine*. **2004**;54:286-290.
- [28] Kladny B, Beyer WF. Nichtmedikamentöse konservative Therapie der Arthrose. *Der Orthopäde*. **2001**;30:848-855.
- [29] Clegg DO, Reda DJ, Harris CL, Klein MA, O'Dell JR, Hooper MM, Bradley JD, Bingham CO, Weisman MH, Jackson CG, Lane NE, Cush JJ, Moreland LW, Schumacher HR, Oddis, CV, Wolfe F, Molitor JA, Yocum DE, Schnitzer TJ, Furst DE, Sawitzke AD, Shi H, Brandt KD, Moskowitz RW, Williams HJ. Glucosamine, chondroitinsulfate and the two in combination for painful knee osteoarthritis. *New England Journal of Medicine*. **2006**;354:795-808.
- [30] Salter RB. The present status of surgical treatment for Legg-Perthes disease. *J Bone Joint Surg Am*. **1994**;66(6):961-966.
- [31] McLaren AC, Blokker CP, Fowler PJ, Roth JN, Block MG. Arthroscopic débridement of the knee for osteoarthrosis. *Canadian Journal of Surgery*. **1991**;34(6):595-598.
- [32] Baumgärtner MR, Cannon WD, Vittori JM, Schmidt JM, Maurer RC. Arthroscopic debridement of the arthritic knee. *Clinical Orthopedics and related Research*. **1990**;253:198-202.
- [33] Pridie KH. A method of resurfacing osteoarthrotic knee joints. *J Bone Joint Surg*. **1959**;41-B:618-619.
- [34] Shapiro M, Koide S, Glimcher M. Cell origin and differentiation in the repair of full thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surgery*. **1993**;75-A:532-553.

- [35] Steinwachs MR, Kreuz PC. Clinical results of Autologous Chondrocyte Transplantation (ACT) using a collagen membrane. Henrich N, ed. *Cartilage Surgery and Future Perspectives*. **2003**;5:37-47.
- [36] Tönnis D. Eine neue Form der Hüftpfannenschwenkung durch Dreifachosteotomie zur Ermöglichung späterer Hüftprothesenversorgung. *Orthopädische Praxis*. **1979**;12:1003-1005.
- [37] Bitzer EM, Grobe TG. **Schwerpunktthema: Trends in der Endoprothetik des Hüft- und Kniegelenks. Barmer GEK Report Krankenhaus 2010**. St. Augustin:Asgard; **2011**.
- [38] Stockwell RA. The cell density of human articular and costal cartilage. *Journal of Anatomy*. **1967**;101:753-763.
- [39] Rudert M, Wirth CJ. Knorpelregeneration und Knorpelersatz. *Der Orthopäde*. **1998**;27:309-321.
- [40] Cohen NP; Foster RJ, Mow VC. Composition and dynamics of articular cartilage: structure, function and maintaining healthy state. *Journal of Orthopedics and Sports, Physical Therapy*. **1998**;28:203-215.
- [41] Bashir A, Gray M, Burstein D. Gd-DTPA²⁻ as a Measure of Cartilage Degradation. *Magnetic Resonance in Medicine*. **1996**;36:665-673.
- [42] Venn M, Maroudas A. Chemical composition and swelling of normal and osteoarthrotic femoral head cartilage. *Annals of the Rheumatic Diseases*. **1977**;36:399-406.
- [43] Bashir A, Gray M, Hartke J, Burstein D. Nondestructive Imaging of Human Cartilage Glycosaminoglycan Concentration by MRI. *Magnetic Resonance in Medicine*. **1999**;41:857-865.
- [44] Vaga S, Brayda-Bruno M, Perona F, Fornari M, Raimondi MT, Petruzzi M, Grava G, Costa F, Caiani EG, Lamartina C. Molecular MR imaging for the evaluation of the effect of dynamic stabilization on lumbar intervertebral discs. *European Spine Journal*. **2009**;18(suppl1):40-48: Published online: DOI 10.1007/s00586-009-0996-7.
- [45] Trattnig S, Mlynarik V, Breitenseher M, Huber M, Zembsch A, Rand T, Imhof H. MRI visualization of proteoglycan depletion in articular cartilage via intravenous administration of Gd-DTPA. *Magn Reson Imaging*. **1999**;17(4):577-583.
- [46] Juras V, Bittsanskya M, Majdisova Z, Szomolanyi P, Sulzbacher I, Gäbler S, Stampfl J, Schüller G, Trattnig S. In vitro determination of biomechanical properties of human articular cartilage in osteoarthritis using multi-parametric MRI. *Journal of Magnetic Resonance*. **2009**;197:40-47.

- [47] Eckstein F, Buck RJ, Wyman BT, Kotyk JJ, Hellio Le Graverand MP, Remmers AE, Evelhoch JE, Hudelmaier M, Charles HC. Quantitative imaging of cartilage morphology at 3.0 Tesla in the presence of Gadopentate Dimeglumine (Gd-DTPA). *Magn Reson Med.* **2007**;58:402-406.
- [48] Tiderius CJ, Jessel R, Kim YJ, Burstein D. Hip dGEMRIC in asymptomatic volunteers and patients with early osteoarthritis: the influence of Timing after contrast injection. *Magn Reson Med.* **2007**;57:803-805.
- [49] Nieminen MT, Rieppo J, Silvennoinen J, Toyras J, Hakumaki JM, Hyttinen MM, Helminen HJ, Jurvelin JS. Spatial. assessment of articular cartilage proteo-glycans with Gd-DTPA-enhanced T1 imaging. *Magn Reson Med.* **2002**;48(4):640-648.
- [50] Burstein D, Velyvis J, Scott KT, Stock KW, Kim YJ, Jaramillo D, Boutin RD, Gray ML. Protocol issues for delayed Gd(DTPA)₂ -Enhanced MRI (dGEMRIC) for clinical evaluation of articular cartilage. *Magn Reson Med.* **2001**;45:36-41.
- [51] Tiderius CJ, Tjörnstrand J. Delayed Gadolinium-Enhanced MRI of Cartilage (dGEMRIC): intra- and interobserver variability in standardized drawing of regions of interest. *Acta Radiologica.* **2004**;6. Published online: DOI 10.1080/02841850410008379.
- [52] Bittersohl B, Hosalkar HS, Haamberg T, Kim YJ, Werlen S, Siebenrock KA, Mamisch TC. Reproducibility of dGEMRIC in Assessment of Hip Joint Cartilage: A Prospective Study. *Journal of MRI.* **2009**;30:224-228.
- [53] Gillis A, Gray M, Burstein D. Relaxivity and diffusion of gadolinium agents in cartilage. *Magn Reson Med.* **2006**;48(6):1068-1071.
- [54] Trattinig S, Burstein D, Szomolanyi P, Pinker K, Welsch GW, Mamisch T. T1(Gd) Gives Comparable Information as Delta T1 Relaxation Rate in dGEMRIC Evaluation of Cartilage Repair Tissue. *Invest Radiol.* **2009**;44:598-602.
- [55] Kimelman T, Vu A, Storey P, McKenzie C, Burstein D, Prasad P. Three-Dimensional T1 Mapping for dGEMRIC at 3.0 T Using the Look Locker Method. *Invest Radiol.* **2006**;41:198-203.
- [56] Li W, Scheidegger R, Wu Y. Accuracy of T1 Measurement With 3-D Look-Locker technique for dGEMRIC. *Journal of MRI.* **2008**;27:678-682.
- [57] Lawrence RC, Helmick CG, Arnett FC, Deyo RA, Felson DT, Giannini EH, Heyse SP, Hirsch R, Hochberg MC, Hunder GG, Liang MH, Pillemer SR, Steen VD, Wolfe F. Estimates of the prevalence of

arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis and Rheumatism*. **1998**;41(5):778-799.

[58] March LM, Bachmeier CMJ. Economics of osteoarthritis: a global perspective. *Baillieres Clinical Rheumatology*. **1997**;11:817-834.

[59] Burstein D, Gray M, Mosher T, Dardzinski B. Measures of molecular composition and structure in osteoarthritis. *Radiologic Clinics of North America*. **2009**;47:675-686. Published online: DOI: 10.1016/j.rcl.2009.04.003

[60] Tiderius CJ, Olsson JE, Nyquist F, Dalberg F. Delayed Gadolinium-Enhanced MRI of Cartilage (dGEMRIC) in Early Knee Osteoarthritis. *Magn Reson Med*. **2003**;49:488-492.

[61] Williams A, Sharma L, McKenzie CA, Prasad PV, Burstein D. Delayed Gadolinium-Enhanced Magnetic Resonance Imaging of Cartilage in Knee Osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*. **2005**;52(11):3528-3535. Published online: DOI 10.1002/art.21388.

[62] Nojiri T, Watanabe N, Namura T, Narita W, Ikoma K, Suginosita T, Takamiya H, Komiyama H, Ito H, Nishimura T, Kubo T. Utility of delayed gadolinium-enhanced MRI (dGEMRIC) for qualitative evaluation of articular cartilage of patellofemoral joint. *Knee Surgery Sports Traumatologic Arthroscopy*. **2006**;14:718-723.

[63] An Yuehuei H, Friedman RJ. Animal selections in orthopaedic research; In: An Yuehuei H; Friedman RJ, Ed. *Animal models in orthopaedic research*. Boca Raton(Fla.):CRC Press; **1998**:39-57.

[64] Martini L, Fini M, Giavaresi G, Giardino R. Sheep model in orthopedic research: a literature review; *Comp Med*. **2001**;51(4):292-299.

[65] Peters C, Hines JL, Bachus KN, Craig MA, Bloebaum RD. Biological effects of calcium sulfate as a bone graft substitute in ovine metaphysical defects. Published online in *Wiley InterScience* (www.interscience.wiley.com): DOI: 10.1002/jbm.a.30569; 11/**2005**.

[66] Turner A. The Sheep as a model for osteoporosis in humans. *Veterinary Journal*. **2002**; 163(3):232-239.

[67] Ghosh P, Armstrong S, Read R, Numata Y, Smith S, McNair P, Marshall R. Animal models of early osteoarthritis: their use for the evaluation of potential chondroprotective agents. *Agents and Actions Supplements*. **1993**;39:195-206.

- [68] Appleyard C, Burkhardt D, Ghosh P, Read R, Cake M, Swain MV, Murrell GAC. Topographical analysis of the structural, biochemical and dynamic biomechanics properties of cartilage in an ovine model of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. **2003**;11:65-77.
- [69] Burger C, Mueller M, Wlodarczyk P, Goost H, Tolba RH, Rangger C, Kabir K, Weber O. The sheep as a knee osteoarthritis model: early cartilage changes after meniscus injury and repair. *Laboratory Animals*. **2007**;41:420-431.
- [70] Philips TW, Johnston G, Wood P. Selection of an Animal Model for Resurfacing Hip Arthroplasty; The *Journal of Arthroplasty*. **1987**;2(2):111-117.
- [71] Den Boer FC, Patka, P, Bakker FC, Wippermann, BW, Van Lingen A, Vink GQ, Boshuizen K, Haarman HJ. New segmental long bone defect model in sheep: quantitative analysis of healing with dual energy x-ray absorptiometry. *J Orthop Res*. **1999**;17(5):654-660.
- [72] Schulze-Tanzil G. Tiermodelle zur Etablierung und Optimierung von Knorpelersatztherapien bei Knorpelschaden, Vortrag, 42. *Seminar über Versuchstiere und Tierversuche*. Berlin; 09/2013.
- [73] Giannoni P, Crovache A, Malpeli M, Maggi E, Abrico R, Cancellà R, Dozin B. Species variability in the differentiation of in vitro-expanded articular chondrocytes restricts predictive studies on cartilage repair using animal models. *Tissue Engineering*. **2005**;11(1/2):237-248.
- [74] Kimura T. Bipedal and quadrupedal walking of primates. In: Kondo S, ed. *Comparative dynamics In Primate Morphophysiology, Locomotor Analyses and Human Bipedalism*. Tokio: University of Tokyo Press; **1985**:81-104.
- [75] Bergmann G, Graichen F, Rohlmann A. Hip joint forces in sheep. *Journal of Biomechanics*. **1999**;32(8):769-777.
- [76] Phillips TW, Gurr K. A preconditioned arthritic hip model. *Journal of Arthroplasty*. **1989**;3:193-200.
- [77] Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips, correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am*. **1971**;53:523-537.
- [78] Zilkens C, Miese F, Herten M, Kurzidem S, Jäger M, König D, Antoch G, Krauspe R, Bittersohl B. Reliability of gradient-echo three-dimensional delayed gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging of hip joint cartilage: a histologically controlled study. *European Journal of Radiology*. Published online: DOI 10.1016/j.ejrad.2012.09.024; **2012**.

- [79] Uhl M, Allmann KH, Tauer U, Laubenberger J, Adler CP, Ihling C, Langer M. Comparison of MR sequences in quantifying in vitro cartilage degeneration in osteoarthritis of the knee. *British Journal of Radiology*. **1998**;71(843):291-296.
- [80] Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues, the Säge-Schliff (sawing and grinding) techniques. *Oral Pathology*. **1982**;11(4):318-326.
- [81] Bittersohl B, Steppacher S, Haamberg T, Kim YJ, Werlen S, Becky M, Siebenrock KA, Mamisch TC. Cartilage damage in femoroacetabular impingement (FAI): preliminary results on comparison of standard diagnostic vs delayed gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging of cartilage (dGEMRIC). *Osteoarthritis and Cartilage*. **2009**;17:1297-1306.
- [82] Jessel R, Zilkens C, Tiderius C, Dudda M, Mamisch TC, Kim YJ. Assessment of osteoarthritis in hips with femoroacetabular impingement using delayed gadolinium enhanced MRI of cartilage. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. **2009**;30:1110-1115.
- [83] Zilkens C, Holstein A, Bittersohl B, Jäger M, Haamberg T, Miese F, Kim YJ, Mamisch TC, Krauspe R. Delayed Gadolinium-enhanced Magnetic Resonance Imaging of Cartilage in the Long-term Follow-up After Perthes Disease. *Journal of Pediatric Orthopedics*. **2010**;30:147-153.
- [84] Kim YJ, Jaramillo D, Millis MB; Gray ML, Burstein D. Assessment of early osteoarthritis in hip dysplasia with delayed gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging of cartilage. *J Bone Joint Surg Am*. **2003**;85(10):1987–1992.
- [85] Trattnig S, Millington SA, Szomolanyi P, Marlovits S. MR imaging of osteochondral grafts and autologous chondrocyte implantation. *European Journal of Radiology*. **2007**;17:103-118. Published online: DOI 10.1007/s00330-006-0333-z.
- [86] Trattnig S, Mamisch TC, Pinker K, Domayer S, Szomolanyi P, Marlovits S, Kutscha-Lissberg F, Welsch GH. Differentiating normal hyaline cartilage from post-surgical repair tissue using fast gradient echo imaging in delayed gadolinium-enhanced MRI (dGEMRIC) at 3 Tesla. *European Journal of Radiology*. **2008**;18:1251–1259. Published online: DOI 10.1007/s00330-008-0859-3.
- [87] Watanabe A, Wada Y, Obata T, Ueda T, Tamura M, Ikehira H, Moriya H. Delayed gadolinium-enhanced MR to determine glycosaminoglycan concentration in reparative cartilage after autologous chondrocyte implantation: preliminary results. *Radiology*. **2006**;239(1):201-208.
- [88] Domayer SE, Welsch GH, Nehrer S, Chiari C, Dorotka R, Szomolanyi P, Mamisch TC, Yayon A, Trattnig S. T2 mapping and dGEMRIC after autologous chondrocyte implantation with a fibrin-based

scaffold in the knee: Preliminary results. *European Journal of Radiology*. **2009**. Published online: DOI 10.1016/j.ejrad.2008.12.006.

[89] Gillis A, Bashir A, McKeon B, Scheller A, Gray M, Burstein D. Magnetic Resonance Imaging of relative glycosaminoglycan distribution in patients with autologous chondrocyte transplants. *Investigative Radiology*. **2001**;36(12):743-748.

[90] Cunningham T, Jessel R, Zurakowski D, Millis MB, Kim YJ. Delayed gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging of cartilage to predict early failure of Bernese periacetabular osteotomy for hip dysplasia. *J Bone Joint Surg Am*. **2006**;88:1540-1548.

[91] Owman H, Tiderius CJ, Neuman P, Nyquist F, Dahlberg LE. Association Between Findings on Delayed Gadolinium-Enhanced Magnetic Resonance Imaging of Cartilage and Future Knee Osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*. **2008**;58(6):1727-1730. Published online: DOI 10.1002/art.23459.

[92] Roos EM, Dahlberg L. Positive Effects of Moderate Exercise on Glycosaminoglycan Content in Knee Cartilage. *Arthritis and Rheumatism*. **2005**;52(11):3507-3514. Published online: DOI 10.1002/art.21415.

[93] Gray M, Burstein D, Kim YJ, Maroudas A. Magnetic Resonance Imaging of Cartilage Glycosaminoglycan: Basic Principles, Imaging Technique, and Clinical Applications. Published online in *Wiley InterScience* (www.interscience.wiley.com); DOI 10.1002/jor.20482; 09/**2007**.

[94] Gray M. Toward Imaging Biomarkers for Glycosaminoglycans. *J Bone Joint Surg Am*. **2009**;91:44-49. Published online: doi:10.2106/JBJS.H.01498.

[95] Goebel JC, Watrin-Pinzano A, Bettembourg-Brault I, Odille F, Felblinger J, Chary-Valckenaere I, Netter P, Blum A, Gillet P, Loeuille D. Age-related quantitative MRI changes in healthy cartilage: Preliminary results. *Biorheology*. **2006**;43:547-551.

[96] Kurkijärvi JE, Nissi MJ, Kiviranta I, Jurvelin JS, Nieminen MT. Delayed Gadolinium-Enhanced MRI of Cartilage (dGEMRIC) and T2 Characteristics of Human Knee Articular Cartilage: Topographical Variation and Relationships to Mechanical Properties. *Magn Reson Med*. **2004**;52:41-46.

[97] Anandacoomarasamy A, Giuffre B, Leibman S, Caterson IA, Smith G, Fransen M, Sambrook P and March LM. Delayed Gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging of cartilage: clinical associations in obese adults. *The Journal of Rheumatology*. **2009**(36). Published online: DOI:10.3899/jrheum.080997.

- [98] Trattnig S, Domayer S, Welsch GW, Mosher T and Eckstein F. MR imaging of cartilage and its repair in the knee - a review. *Eur Radiol.* **2009**;19:1582–1594.
- [99] Peretti GM, Xu JW, Bonassar LJ, Kirchhoff CH, Yaremchuk MJ, Randolph MA. Review of injectable cartilage engineering using fibrin gel in mice and swine models. *Tissue Engineering.* **2006**;12:1151-1168
Published online: DOI 10.1089/ten.2006.12.1151.
- [100] Stoop R, Buma P, van der Kraan PM, Hollander AP, Clark Billingham R, Meijers THM, Poole AR, van der Berg WB. Type II collagen degradation in articular cartilage fibrillation after anterior cruciate ligament transection in rats. *Osteoarthritis and Cartilage.* **2001**;9:308-315.
- [101] Watrin-Pinzano A, Ruaud JP, Cheli Y, Gonord P, Grossin L, Bettembourg-Brault I, Gillet P, Payan E, Guillot G, Netter P, Loeuille D. Evaluation of cartilage repair tissue after biomaterial implantation in rat patella by using T2 mapping. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine (MAGMA).* **2004**;17:219-228. Published online: DOI 10.1007/s10334-004-0071-7.
- [102] Elliott DM, Yerramalli CS, Beckstein JC, Boxberger JI, Johannessen W, Vresilovic J. The effect of relative needle diameter in puncture and sham injection animal models of degeneration. *Spine.* **2008**;33(6):588-596.
- [103] Tiderius C, Hori M, Williams A, Sharma L, Prasad P, Finnell M, McKenzie C, Burstein D. dGEMRIC as a function of BMI. *Osteoarthritis and Cartilage.* **2006**;14:1091-1097.
- [104] Dye S. An evolutionary perspective of the knee. *J Bone and Joint Surgery.* **1987**;69-A(7):977-983.
- [105] Schulze-Tanzil G, Muller RD, Kohl B, Schneider N, Ertel W, Ipaktchi K, Hunigen H, Gemeinhardt O, Stark R, John T. Differing in vitro biology of equine, ovine, porcine and human articular chondrocytes derived from the knee joint: an immunomorphological study. *Histochemistry and Cell Biology.* **2009**;131:219-229. Published online: DOI 10.1007/s00418-008-0516-6.
- [106] Dugar D, Farley M, Wang AL, Goldring MB, Goldring S, Swaim BH, Bierbaum BE, Burstein D, Gray M. The Effect of Paraformaldehyde Fixation on the Delayed Gadolinium-Enhanced MRI of Cartilage (dGEMRIC) Measurement. Published online in *Wiley InterScience* (www.interscience.wiley.com); DOI 10.1002/jor.20767; 09/2008.

7. Appendix

7.1 Abbildungsnachweis

Abb. 1	Mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. Olga Grinstein, Institut für diagnostische und interventionelle Radiologie der Universitätsklinik Köln
Abb. 2	Mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. Olga Grinstein, Institut für diagnostische und interventionelle Radiologie der Universitätsklinik Köln
Abb. 3	Grafik erstellt durch die Forschungsgruppe Zilkens, Miese, Jäger et al. mit Unterstützung des Instituts für diagnostische und interventionelle Radiologie der Universitätsklinik Düsseldorf; veröffentlicht in: <i>Orthopedic Reviews</i> . 2011;3:9.
Abb. 4	Grafik erstellt durch die Forschungsgruppe Zilkens, Miese, Crumbiegel et al.
Abb. 5	Fotografie erstellt durch die Forschungsgruppe Zilkens, Miese, Crumbiegel et al.
Abb. 6	Fotografie erstellt durch die Forschungsgruppe Zilkens, Miese, Crumbiegel et al.
Abb. 7	Fotografie erstellt durch die Forschungsgruppe Zilkens, Miese, Crumbiegel et al.
Abb. 8	Fotografie erstellt durch die Forschungsgruppe Zilkens, Miese, Crumbiegel et al.
Abb. 9	Fotografien erstellt durch die Forschungsgruppe Zilkens, Miese, Crumbiegel et al.
Abb. 10	Grafik erstellt durch die Forschungsgruppe Zilkens, Miese, Crumbiegel et al. mit Unterstützung des Instituts für diagnostische und interventionelle Radiologie der Universitätsklinik Düsseldorf; veröffentlicht in: <i>Skeletal Radiology</i> . 2013;42(5):699-705.
Abb. 11	Aus: Haamberg T; Dissertation: Beurteilung der Knorpelqualität an Hüftgelenken mittels des MRT Verfahrens <i>delayed Gadolinium Enhanced MRI of Cartilage (dGEMRIC)</i> im Langzeitverlauf nach Morbus Perthes
Abb. 12	Mit Unterstützung des Instituts für diagnostische und interventionelle Radiologie der Universitätsklinik Düsseldorf, Fotografie erstellt durch die Forschungsgruppe Zilkens, Miese, Crumbiegel et al.

Abb. 13	Aus: Haamberg T; Dissertation: Beurteilung der Knorpelqualität an Hüftgelenken mittels des MRT Verfahrens <i>delayed Gadolinium Enhanced MRI of Cartilage (dGEMRIC)</i> im Langzeitverlauf nach Morbus Perthes
Abb. 14	Grafik erstellt durch die Forschungsgruppe Zilkens, Miese, Crumbiegel et al. mit Unterstützung des Instituts für diagnostische und interventionelle Radiologie der Universitätsklinik Düsseldorf; veröffentlicht in: <i>Skeletal Radiology</i> . 2013;42(5):699-705.
Abb. 15	Fotografie erstellt durch die Forschungsgruppe Zilkens, Miese, Crumbiegel et al.
Abb. 16	Fotografie erstellt durch die Forschungsgruppe Zilkens, Miese, Crumbiegel et al.
Abb. 17	Fotografie erstellt durch die Forschungsgruppe Zilkens, Miese, Crumbiegel et al.
Abb. 18	Fotografie erstellt durch die Forschungsgruppe Zilkens, Miese, Crumbiegel et al.
Abb. 19	Grafiken erstellt durch die Forschungsgruppe Zilkens, Miese, Crumbiegel et al. mit Unterstützung des Instituts für diagnostische und interventionelle Radiologie der Universitätsklinik Düsseldorf; veröffentlicht in: <i>Skeletal Radiology</i> . 2013;42(5):699-705.
Abb. 20	Grafik erstellt durch die Forschungsgruppe Zilkens, Miese, Crumbiegel et al. mit Unterstützung des Instituts für diagnostische und interventionelle Radiologie der Universitätsklinik Düsseldorf; veröffentlicht in: <i>Skeletal Radiology</i> . 2013;42(5):699-705.
Abb. 21	Grafik erstellt durch die Forschungsgruppe Zilkens, Miese, Crumbiegel et al. mit Unterstützung des Instituts für diagnostische und interventionelle Radiologie der Universitätsklinik Düsseldorf; veröffentlicht in: <i>Skeletal Radiology</i> . 2013;42(5):699-705.
Abb. 22	Fotografie erstellt durch die Forschungsgruppe Zilkens, Miese, Crumbiegel et al.
Abb. 23	Fotografie erstellt durch die Forschungsgruppe Zilkens, Miese, Crumbiegel et al.

7.2 Tabellen

Nummer	Hüftkopf	Schnitt	Region	H_Schnitt	Dess	T1	ROI	Mankin Gesamt	Mankin Struktur	Mankin Toluidin
1	L_01	1	A	1	0	588,5	0,03	0	0	0
2	L_01	1	B	1	0	482,4	0,01	0	0	0
3	L_01	1	C	1	0	597,6	0,02	0	0	0
4	L_01	2	A	3	0	600,9	0,03	1	1	0
5	L_01	2	B	3	0	505,5	0,03	1	1	0
6	L_01	2	C	3	0	649,0	0,04	1	1	0
7	L_01	3	A	5	0	550,2	0,04	1	1	0
8	L_01	3	B	5	0	488,1	0,04	1	1	0
9	L_01	3	C	5	0	602,7	0,02	1	1	0
10	L_01	4	A	7	0	561,8	0,02	1	1	0
11	L_01	4	B	7	0	527,1	0,02	1	1	0
12	L_01	4	C	7	0	676	0,03	1	1	0
13	L_01	5	A	9	0	584,5	0,04	1	1	0
14	L_01	5	B	9	0	494,9	0,04	1	1	0
15	L_01	5	C	9	0	566,2	0,03	1	1	0
16	L_02	1	A	1	0	698,6	0,03	1	1	0
17	L_02	1	B	1	0	553	0,02	1	1	0
18	L_02	1	C	1	0	629,1	0,03	1	1	0
19	L_02	2	A	3	0	615,1	0,05	1	1	0
20	L_02	2	B	3	0	620,2	0,02	1	1	0
21	L_02	2	C	3	0	648,8	0,01	1	1	0
22	L_02	3	A	5	0	671,6	0,03	1	1	0
23	L_02	3	B	5	0	601,4	0,03	1	1	0
24	L_02	3	C	5	0	753,8	0,03	1	1	0
25	L_02	4	A	7	0	701,4	0,02	1	1	0
26	L_02	4	B	7	0	607,2	0,04	1	1	0
27	L_02	4	C	7	0	792,2	0,02	1	1	0
28	L_02	5	A	10	0	629,8	0,04	1	1	0
29	L_02	5	B	10	0	745	0,03	1	1	0
30	L_02	5	C	10	0	700,8	0,03	1	1	0
31	L_03	1	A	1	0	722,8	0,03	1	1	0
32	L_03	1	B	1	0	582,2	0,02	1	1	0
33	L_03	1	C	1	0	655,1	0,03	1	1	0
34	L_03	2	A	2	0	590,6	0,04	1	1	0
35	L_03	2	B	2	0	580,8	0,02	1	1	0
36	L_03	2	C	2	0	756,6	0,02	1	1	0
37	L_03	3	A	5	0	725,9	0,02	0	0	0
38	L_03	3	B	5	0	594	0,02	0	0	0
39	L_03	3	C	5	0	721,9	0,02	0	0	0

40	L__03	4	A	6	0	706,1	0,02	1	1	0
41	L__03	4	B	6	0	604	0,02	1	1	0
42	L__03	4	C	6	0	798,6	0,02	1	1	0
43	L__03	5	A	7	0	665,2	0,02	0	0	0
44	L__03	5	B	7	0	644,5	0,02	0	0	0
45	L__03	5	C	7	0	773,3	0,02	0	0	0
46	L__04	1	A	1	0	676,8	0,02	1	1	0
47	L__04	1	B	1	0	667,2	0,01	1	1	0
48	L__04	1	C	1	0	703,7	0,02	1	1	0
49	L__04	2	A	2	0	672	0,02	1	1	0
50	L__04	2	B	2	0	587,5	0,02	1	1	0
51	L__04	2	C	2	0	672	0,02	1	1	0
52	L__04	3	A	5	0	627,9	0,03	1	1	0
53	L__04	3	B	5	0	681,3	0,03	1	1	0
54	L__04	3	C	5	0	658,5	0,02	1	1	0
55	L__04	4	A	7	0	656,1	0,02	2	1	1
56	L__04	4	B	7	0	643,6	0,02	2	1	1
57	L__04	4	C	7	0	715,2	0,02	2	1	1
58	L__04	5	A	8	0	636,1	0,02	1	1	0
59	L__04	5	B	8	0	658,8	0,01	1	1	0
60	L__04	5	C	8	0	692	0,01	1	1	0
61	L__05	1	A	1	0	513,8	0,02	0	0	0
62	L__05	1	B	1	0	507,4	0,02	0	0	0
63	L__05	1	C	1	0	529,1	0,02	0	0	0
64	L__05	2	A	2	0	483,6	0,03	1	1	0
65	L__05	2	B	2	0	496,8	0,01	1	1	0
66	L__05	2	C	2	0	568,8	0,01	1	1	0
67	L__05	3	A	4	0	566	0,02	0	0	0
68	L__05	3	B	4	0	629,5	0,02	0	0	0
69	L__05	3	C	4	0	692,1	0,01	0	0	0
70	L__05	4	A	6	0	610,4	0,03	1	1	0
71	L__05	4	B	6	0	630,6	0,02	1	1	0
72	L__05	4	C	6	0	651,9	0,02	1	1	0
73	L__05	5	A	8	0	573,3	0,03	1	1	0
74	L__05	5	B	8	0	631,5	0,02	1	1	0
75	L__05	5	C	8	0	587,5	0,02	1	1	0
76	L__06	1	A	1	0	566,2	0,02	0	0	0
77	L__06	1	B	1	0	654,2	0,01	0	0	0
78	L__06	1	C	1	0	639,5	0,02	0	0	0
79	L__06	2	A	2	0	559,8	0,01	0	0	0
80	L__06	2	B	2	0	698,4	0,01	0	0	0
81	L__06	2	C	2	0	622,6	0,01	0	0	0
82	L__06	3	A	5	0	515,1	0,01	0	0	0

83	L__06	3	B	5	0	604,6	0,02	0	0	0
84	L__06	3	C	5	0	616,7	0,01	0	0	0
85	L__06	4	A	10	0	533,9	0,01	0	0	0
86	L__06	4	B	10	0	519,8	0,01	0	0	0
87	L__06	4	C	10	0	584,4	0,01	0	0	0
88	L__06	5	A	12	0			0	0	0
89	L__06	5	B	12	0	499,3	0,02	0	0	0
90	L__06	5	C	12	0	523,9	0,02	0	0	0
91	L__07	1	A	2	0			1	1	0
92	L__07	1	B	2	0	645,6	0,02	1	1	0
93	L__07	1	C	2	0	651,9	0,04	1	1	0
94	L__07	2	A	4	0	584,9	0,04	0	0	0
95	L__07	2	B	4	0	693,3	0,02	0	0	0
96	L__07	2	C	4	0	660,2	0,02	0	0	0
97	L__07	3	A	7	0	631,8	0,03	1	1	0
98	L__07	3	B	7	0	676,1	0,03	1	1	0
99	L__07	3	C	7	0	550,2	0,03	1	1	0
100	L__07	4	A	8	0	521,8	0,03	0	0	0
101	L__07	4	B	8	0	553,4	0,03	0	0	0
102	L__07	4	C	8	0	610,6	0,02	0	0	0
103	L__07	5	A	9	0	517,8	0,01	1	1	0
104	L__07	5	B	9	0	618	0,02	1	1	0
105	L__07	5	C	9	0	454,6	0,03	1	1	0
106	L__08	1	A	2	0			0	0	0
107	L__08	1	B	2	0	513,3	0,02	0	0	0
108	L__08	1	C	2	0	554,4	0,04	0	0	0
109	L__08	2	A	3	0			0	0	0
110	L__08	2	B	3	0	522,4	0,02	0	0	0
111	L__08	2	C	3	0	537,8	0,02	0	0	0
112	L__08	3	A	5	0	588,1	0,01	0	0	0
113	L__08	3	B	5	0	587,3	0,02	0	0	0
114	L__08	3	C	5	0	639,3	0,02	0	0	0
115	L__08	4	A	9	0			1	1	0
116	L__08	4	B	9	0	596,1	0,04	1	1	0
117	L__08	4	C	9	0	603,2	0,03	1	1	0
118	L__08	5	A	13	0			1	1	0
119	L__08	5	B	13	0	573,3	0,02	1	1	0
120	L__08	5	C	13	0	637,6	0,02	1	1	0
121	L__09	1	A	2	0	700,1	0,02	1	1	0
122	L__09	1	B	2	0	712,8	0,02	1	1	0
123	L__09	1	C	2	0	687,4	0,02	1	1	0
124	L__09	2	A	4	0	712,9	0,02	1	1	0
125	L__09	2	B	4	0	678,3	0,02	1	1	0

126	L__09	2	C	4	0	672,5	0,02	1	1	0
127	L__09	3	A	6	0	685,4	0,02	1	1	0
128	L__09	3	B	6	0	730,2	0,02	1	1	0
129	L__09	3	C	6	0	639,5	0,03	1	1	0
130	L__09	4	A	9	0	610,2	0,02	1	1	0
131	L__09	4	B	9	0	686,2	0,02	1	1	0
132	L__09	4	C	9	0	593,6	0,03	1	1	0
133	L__09	5	A	10	0	763,2	0,02	1	1	0
134	L__09	5	B	10	0	770,5	0,01	1	1	0
135	L__09	5	C	10	0	607,6	0,03	1	1	0
136	L__10	1	A	1	0	596,4	0,03	0	0	0
137	L__10	1	B	1	0	643,8	0,01	0	0	0
138	L__10	1	C	1	0	638,2	0,01	0	0	0
139	L__10	2	A	3	0	712	0,02	1	1	0
140	L__10	2	B	3	0	698,3	0,02	1	1	0
141	L__10	2	C	3	0	602,9	0,01	1	1	0
142	L__10	3	A	7	0	698	0,02	1	1	0
143	L__10	3	B	7	0	680,8	0,02	1	1	0
144	L__10	3	C	7	0	559,2	0,02	1	1	0
145	L__10	4	A	8	0	682	0,02	1	1	0
146	L__10	4	B	8	0	678,1	0,02	1	1	0
147	L__10	4	C	8	0	587,6	0,01	1	1	0
148	L__10	5	A	9	0	629,5	0,02	0	0	0
149	L__10	5	B	9	0	607,7	0,02	0	0	0
150	L__10	5	C	9	0	492	0,01	0	0	0
151	S__01	1	A	2						
152	S__01	1	B	2	0	792,4	0,02	0	0	0
153	S__01	1	C	2	0	775,3	0,06	0	0	0
154	S__01	2	A	3				0	0	0
155	S__01	2	B	3	0	733,4	0,04	0	0	0
156	S__01	2	C	3	0	884	0,05	0	0	0
157	S__01	3	A	6				0	0	0
158	S__01	3	B	6	0	794,9	0,03	0	0	0
159	S__01	3	C	6	1	448,4	0,05	0	0	0
160	S__01	4	A	8				0	0	0
161	S__01	4	B	8	0	808	0,03	0	0	0
162	S__01	4	C	8	1	713,9	0,05	0	0	0
163	S__01	5	A	10				0	0	0
164	S__01	5	B	10	0	843,6	0,04	0	0	0
165	S__01	5	C	10	1	692,8	0,04	0	0	0
166	S__02	1	A	1						
167	S__02	1	B	1	0	532,7	0,02	0	0	0
168	S__02	1	C	1	2	384,5	0,05	4	3	1

169	S_02	2	A	3						
170	S_02	2	B	3	0	724,6	0,03	0	0	0
171	S_02	2	C	3	1	498,9	0,04	4	3	1
172	S_02	3	A	5						
173	S_02	3	B	5	0	530,2	0,04	0	0	0
174	S_02	3	C	5	1	443,9	0,05	5	4	1
175	S_02	4	A	7						
176	S_02	4	B	7	0	579,8	0,02	0	0	0
177	S_02	4	C	7	0	475,3	0,04	1	1	0
178	S_02	5	A	8						
179	S_02	5	B	8	0	639,9	0,04	0	0	0
180	S_02	5	C	8	0	478,8	0,04	1	1	0
181	S_03	1	A	2	0	590,4	0,02	1	0	1
182	S_03	1	B	2	0	604,7	0,02	1	0	1
183	S_03	1	C	2	1	449,5	0,04	5	4	1
184	S_03	2	A	3	1	579,3	0,02	1	0	1
185	S_03	2	B	3	0	426,1	0,03	1	0	1
186	S_03	2	C	3	2	393,1	0,05	5	4	1
187	S_03	3	A	5	0	584,9	0,03	1	0	1
188	S_03	3	B	5	0	529,4	0,03	1	0	1
189	S_03	3	C	5	1	470	0,04	4	3	1
190	S_03	4	A	8	0	532,3	0,02	0	0	0
191	S_03	4	B	8	0	578,2	0,03	0	0	0
192	S_03	4	C	8	0	548,4	0,03	1	1	0
193	S_03	5	A	11	0			1	1	0
194	S_03	5	B	11	0	556,7	0,02	0	0	0
195	S_03	5	C	11	0	582,7	0,04	0	0	0
196	S_04	1	A	1	0	539,2	0,02	0	0	0
197	S_04	1	B	1	0	562,2	0,02	0	0	0
198	S_04	1	C	1	0	509,2	0,05	1	0	1
199	S_04	2	A	3	0	450	0,03	0	0	0
200	S_04	2	B	3	0	559,9	0,03	0	0	0
201	S_04	2	C	3	0	486,3	0,03	1	0	1
202	S_04	3	A	6	0	581,1	0,03	0	0	0
203	S_04	3	B	6	0	479,6	0,04	0	0	0
204	S_04	3	C	6	0	521,9	0,05	0	0	0
205	S_04	4	A	11	0	617,3	0,01	0	0	0
206	S_04	4	B	11	0	555,6	0,03	0	0	0
207	S_04	4	C	11	0	521,8	0,05	0	0	0
208	S_04	5	A	13	0	660	0,01	0	0	0
209	S_04	5	B	13	0	631	0,02	0	0	0
210	S_04	5	C	13	0	527,9	0,05	0	0	0
211	S_05	1	A	1	0	536,8	0,01	0	0	0

212	S_05	1	B	1	0	537,1	0,01	0	0	0
213	S_05	1	C	1	1	447,6	0,01	4	3	1
214	S_05	2	A	3	0	520,7	0,02	0	0	0
215	S_05	2	B	3	1	505,3	0,03	0	0	0
216	S_05	2	C	3	1	464,8	0,03	5	4	1
217	S_05	3	A	5	0	543,1	0,01	0	0	0
218	S_05	3	B	5	0	552,7	0,02	0	0	0
219	S_05	3	C	5	1	457,2	0,03	4	4	0
220	S_05	4	A	6	0	515,9	0,03	0	0	0
221	S_05	4	B	6	0	518	0,02	0	0	0
222	S_05	4	C	6	1	439,3	0,02	3	3	0
223	S_05	5	A	8				0	0	0
224	S_05	5	B	8	1	590,3	0,02	0	0	0
225	S_05	5	C	8	1	428	0,06	0	0	0
226	S_06	1	A	1				0	0	0
227	S_06	1	B	1		514,4	0,02	0	0	0
228	S_06	1	C	1		552,5	0,03	0	0	0
229	S_06	2	A	3				0	0	0
230	S_06	2	B	3		576,9	0,02	0	0	0
231	S_06	2	C	3		522,3	0,02	0	0	0
232	S_06	3	A	5				0	0	0
233	S_06	3	B	5		495,5	0,02	0	0	0
234	S_06	3	C	5		514,7	0,02	0	0	0
235	S_06	4	A	7				0	0	0
236	S_06	4	B	7		558,7	0,02	0	0	0
237	S_06	4	C	7		519,7	0,02	0	0	0
238	S_06	5	A	10				0	0	0
239	S_06	5	B	10		545,2	0,02	0	0	0
240	S_06	5	C	10		498,8	0,02	0	0	0
241	S_07	1	A	1	0	588,2	0,02	0	0	0
242	S_07	1	B	1	0	578,1	0,02	0	0	0
243	S_07	1	C	1	0	531,8	0,07	0	0	0
244	S_07	2	A	2	0	594,1	0,02	0	0	0
245	S_07	2	B	2	0	550,5	0,03	0	0	0
246	S_07	2	C	2	1	480,2	0,04	0	0	0
247	S_07	3	A	4	0	597	0,01	0	0	0
248	S_07	3	B	4	0	524,3	0,03	0	0	0
249	S_07	3	C	4	1	506,3	0,06	1	1	0
250	S_07	4	A	6	0	596,8	0,03	0	0	0
251	S_07	4	B	6	0	522,6	0,03	0	0	0
252	S_07	4	C	6	1	376,6	0,05	2	1	1
253	S_07	5	A	9	0	588,9	0,01	0	0	0
254	S_07	5	B	9	0	583,2	0,02	1	0	1

255	S_07	5	C	9	1	387,2	0,05	1	0	1
256	S_08	1	A	1	0	587,6	0,01	0	0	0
257	S_08	1	B	1	0	564,2	0,01	0	0	0
258	S_08	1	C	1	0	547,2	0,05	0	0	0
259	S_08	2	A	2	0	577	0,02	0	0	0
260	S_08	2	B	2	0	589,8	0,03	0	0	0
261	S_08	2	C	2	0	526	0,04	0	0	0
262	S_08	3	A	4	0	546,7	0,02	0	0	0
263	S_08	3	B	4	0	561,2	0,04	0	0	0
264	S_08	3	C	4	1	478,5	0,07	1	0	0
265	S_08	4	A	6	0	546,1	0,03	0	0	0
266	S_08	4	B	6	0	518,2	0,03	1	0	1
267	S_08	4	C	6	1	460,6	0,05	4	3	1
268	S_08	5	A	9	0	539,4	0,05	0	0	0
269	S_08	5	B	9	0	556,4	0,04	1	0	1
270	S_08	5	C	9	1	485	0,09	2	1	1
271	S_09	1	A	2				0	0	0
272	S_09	1	B	2	0	542,6	0,02	0	0	0
273	S_09	1	C	2	1	441,3	0,06	3	3	0
274	S_09	2	A	3				0	0	0
275	S_09	2	B	3		510,9	0,03	0	0	0
276	S_09	2	C	3	2	382,7	0,09	4	4	0
277	S_09	3	A	4	0	568,9	0,03	0	0	0
278	S_09	3	B	4	0	582,2	0,06	0	0	0
279	S_09	3	C	4	2	382,4	0,1	3	3	0
280	S_09	4	A	6	0	564,7	0,05	0	0	0
281	S_09	4	B	6	0	521	0,05	1	0	1
282	S_09	4	C	6	2	360,2	0,1	4	3	1
283	S_09	5	A	8	0	588,6	0,06	0	0	0
284	S_09	5	B	8	0	532	0,05	1	0	1
285	S_09	5	C	8	2	370,9	0,1	4	3	1
286	S_09	6	A	11	0	556,6	0,02	0	0	0
287	S_09	6	B	11	0	554	0,04	0	0	0
288	S_09	6	C	11	2	399,4	0,08	5	4	1
289	S_10	1	A	1	0	543,1	0,02	0	0	0
290	S_10	1	B	1	0	574,4	0,02	0	0	0
291	S_10	1	C	1	2	44,3	0,02	2	1	1
292	S_10	2	A	3	0	523,1	0,03	0	0	0
293	S_10	2	B	3	0	584,4	0,04	1	0	1
294	S_10	2	C	3	1	440,6	0,06	5	4	1
295	S_10	3	A	5	0	584,3	0,03	0	0	0
296	S_10	3	B	5	0	588,7	0,02	0	0	0
297	S_10	3	C	5	1	426,6	0,06	4	3	1

298	S__10	4	A	7	0	503	0,03	0	0	0
299	S__10	4	B	7	0	566,2	0,04	1	0	1
300	S__10	4	C	7	1	425,6	0,05	2	1	1
301	S__10	5	A	9	0	535,5	0,03	0	0	0
302	S__10	5	B	9	0	502,4	0,03	0	0	0
303	S__10	5	C	9	1	371,8	0,05	2	1	1

Danksagung

Ich danke zunächst Herrn Prof. Dr. Rüdiger Krauspe dafür, dass ich die Möglichkeit erhalten durfte, in der Klinik für Orthopädie des Universitätsklinikums Düsseldorf meine Promotionsarbeit durchführen zu können.

Herrn PD Dr. Christoph Zilkens danke ich für die Auswahl des Themas und die produktive Zusammenarbeit bei der Durchführung der Arbeitsschritte sowie seine konstruktiven Vorschläge zur Dissertationsschrift.

Frau Dr. Monika Herten und Herrn PD Dr. Bernd Bittersohl danke ich ebenfalls für die zahlreichen Ideen und Ihre unermüdliche Hilfe, sowie Herrn PD Dr. Falk Miese für seine Mitarbeit bei den radiologischen Aspekten dieser Arbeit.

Meinem Vater Prof. Dieter Crumbiegel möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen für seine konstante und doch niemals aufdringliche Motivation zur Erstellung der Dissertation, auch durch schwierige Zeiten hindurch.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Lebensgefährtin Frau Julia Fey für ihren Beistand und ihre Geduld meinen Dank aussprechen.