

---

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin

An der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

(Direktor: Prof. Dr. med. Werner Hein)



# **Untersuchung mechanischer Parameter der degenerativen Veränderungen an Knorpel und subchondralem Knochen bei primärer Gonarthrose mit hochfrequenten Ultraschalltechniken**

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau

**Sonja Kerstin Leicht**

geb. am 10.7.1977 in Stuttgart

### **Gutachter:**

1. Prof. Dr. Hein, Universitäts- und Poliklinik für Orthopädie u. Physikalische Medizin, Halle
2. Prof. Dr. Neumann, Orthopädische Klinik, Universität Magdeburg
3. Prof. Dr. Perka, Klinik für Orthopädie, Universität Berlin

Verteidigung am 24.05.2007, Klinik für Orthopädie u. Physikalische Medizin, MLU Halle

**urn:nbn:de:gbv:3-000012315**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000012315>]

---

## REFERAT

Mit hochfrequentem Ultraschall können Gewebsstrukturen mit einer hohen örtlichen Auflösung zerstörungsfrei dargestellt werden. Ziel war es, strukturelle und mechanische arthrotische Veränderungen in Knorpel und Knochen an nativen Präparaten mit diesen Techniken quantitativ zu charakterisieren und mit etablierten histologischen Verfahren zu vergleichen. Ultraschallrückstreuungsmessungen wurden an Tibiaplateaus mit dem B-Bild Verfahren bei 80 MHz und an Sagittalschnitten derselben Proben mit dem C-Bild Verfahren bei 50 MHz durchgeführt. Die tiefenabhängige Rückstreuung und orts aufgelöste akustische Impedanz im Knorpel und subchondralen Knochen wurden bekannten radiologisch und histologisch erfassbaren Arthrosezeichen zugeordnet. Dadurch sollte ein besseres Verständnis für die prinzipiell in vivo anwendbare B-Bild Technik gewonnen werden.

28 Resektate humaner Tibiaplateaus aus der Knieendoprothetik und eine Kontrolle ohne Arthrosezeichen wurden untersucht. Die Rückstreuungsmessungen zeigten innerhalb des Knorpels unterschiedliche tiefenabhängige Rückstreumuster, die mit charakteristischen, histologisch und immunhistologisch nachweisbaren Veränderungen assoziiert waren. An Sagittalschnitten konnten anhand der akustischen Impedanz unterschiedliche Knorpelschichten differenziert werden. Innerhalb des Knochens war in 65,5 % der untersuchten Fälle subchondral eine signifikante Sklerosierung zu sehen.

Bevor es im Krankheitsgeschehen zum Substanzabbau kommt - also bei mittleren Werten des Mankin-Scores, zeigte sich im B-Bild ein charakteristisches Rückstreusignal mit einem Maximum kurz unterhalb der Knorpeloberfläche. In niedrigeren Arthrostadien zeigten sich mehrere sehr kleine Peaks, in höheren Stadien verschwanden diese wieder. Es ist von der Ausbildung einer „Repair-Zone“ in mittleren Stadien auszugehen, die in höheren Stadien, wenn der Knorpelverlust eintritt, als Oberfläche detektiert wird.

Das Potential hochfrequenter Ultraschallverfahren zur Charakterisierung arthrotischer Veränderungen konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden. Perspektivisch ergibt sich die Möglichkeit mit Ultraschall ein quantitatives und somit objektives Verfahren zu entwickeln, welches eine minimalinvasive Beurteilung struktureller und mechanischer Veränderungen innerhalb der einzelnen Knorpelschichten in vivo erlaubt und in seiner Aussagekraft mit einer histologischen Beurteilung vergleichbar wird.

*Leicht, Sonja: Untersuchung mechanischer Parameter der degenerativen Veränderungen an Knorpel und subchondralem Knochen bei primärer Gonarthrose mit hochfrequenten Ultraschalltechniken*

*Halle, Univ., Med.Fak., Diss., 66 Seiten, 2006*

---

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Knorpel</b>	<b>2</b>
1.1.1	Aufbau	2
1.1.2	Funktion	5
<b>1.2</b>	<b>Arthrose</b>	<b>6</b>
1.2.1	Definition	6
1.2.2	Ätiologie	7
1.2.3	Pathogenese	7
1.2.4	Klassifikation	8
1.2.5	Therapie	9
<b>1.3</b>	<b>Grundlagen Ultraschall</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>Zielstellung</b>	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>13</b>
<b>3.1</b>	<b>Probengewinnung</b>	<b>13</b>
<b>3.2</b>	<b>Probenpräparation</b>	<b>13</b>
<b>3.3</b>	<b>Rückstreuung (B-Bild Verfahren)</b>	<b>13</b>
<b>3.4</b>	<b>SAM (Scanning Acoustic Microscope; C-Bild Verfahren)</b>	<b>17</b>
3.4.1	Knorpelimpedanz	21
3.4.2	Knochenimpedanz	23
<b>3.5</b>	<b>Histologie und Immunhistochemie</b>	<b>25</b>
<b>3.6</b>	<b>Datenauswertung</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>31</b>
<b>4.1</b>	<b>Rückstreuung (B-Bild Verfahren)</b>	<b>31</b>
<b>4.2</b>	<b>SAM (Scanning Acoustic Microscope; C-Bild Verfahren)</b>	<b>34</b>
4.2.1	Knorpelimpedanz	35
4.2.2	Knochenimpedanz	36
<b>4.3</b>	<b>Histologie und Immunhistochemie</b>	<b>36</b>
<b>4.4</b>	<b>Untersuchung von Parameterabhängigkeiten</b>	<b>38</b>
4.4.1	Test auf Kolinearität	38
4.4.2	Einfluss der Parameter auf die Knorpelimpedanz	39
4.4.3	Einfluss der Parameter auf die Knochenimpedanz	42

<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>44</b>
<b>5.1</b>	<b>Methodik</b>	<b>44</b>
5.1.1	Rückstreuung (B-Bild Verfahren)	45
5.1.2	SAM (Scanning Acoustic Microscope; C-Bild Verfahren)	48
5.1.3	Histologie und Immunhistochemie	49
<b>5.2</b>	<b>Vergleich der angewendeten Verfahren</b>	<b>50</b>
<b>6</b>	<b>Schlussfolgerung</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>55</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>58</b>
<b>9</b>	<b>Thesen</b>	<b>64</b>

---

## ABBILDUNGEN

Abbildung 1-1 Schematische Darstellung eines Proteoglykan-Hyaluronsäurekomplexes. ____	4
Abbildung 3-1 Prinzipieller Messaufbau der verwendeten Mikroskope. _____	14
Abbildung 3-2 Typisches Puls-Echo Signal. _____	15
Abbildung 3-3 Auswertung der Rückstreuparameter. _____	17
Abbildung 3-4 Linkes Tibiaplateau in Aufsicht. _____	18
Abbildung 3-5 Oberflächentopographie des Knorpels. _____	19
Abbildung 3-6 Typische Puls-Echo Signale und Einhüllkurve von der Knorpelgrenzfläche und der Knochengrenzfläche. _____	20
Abbildung 3-7 Darstellung der Impedanzen im Knorpel. _____	22
Abbildung 3-8 Impedanzen der ROIs nach Anzahl der Messpunkte und Darstellung der unterschiedlichen Impedanzwerte. _____	23
Abbildung 3-9 Darstellung der Impedanzen des subchondralen Knochens mit deutlich sichtbarer subchondraler Sklerosierung. _____	24
Abbildung 3-10 Akustisches Reflexionsbild einer Knorpel - Knochengrenzschicht eines Tibiaplateaus bei 200 MHz. _____	25
Abbildung 3-11 Safranin-O Färbungen (Gegenfärbung mit Lichtgrün). _____	28
Abbildung 3-12 Färbungen mit Tenascin-C Antikörpern. _____	29
Abbildung 4-1 Übersichtsmessung einer Probe mit starker Destruktion und einer weniger destruierten. _____	31
Abbildung 4-2 Akustisches Schnittbild einer arthrotisch veränderten Probe und der Kontrollprobe. _____	32
Abbildung 4-3 Tiefenabhängige Analyse der Rückstreumuster der arthrotisch veränderten Probe aus Abbildung 4-2 links. _____	33
Abbildung 4-4 Tiefenabhängige Analyse der Rückstreumuster der Kontrolle aus Abbildung 4-2 rechts. _____	33
Abbildung 4-5 Impedanzverteilung innerhalb des Knorpels einer Probe mit höherem Arthrosegrad im Vergleich mit der Kontrolle. _____	34
Abbildung 4-6 Impedanzverteilung des Knochens einer Probe mit höherem Arthrosegrad im Vergleich mit der Kontrolle. _____	35
Abbildung 4-7 Abhängigkeit der mittleren Impedanzen von den einzelnen Knorpelschichten; als Box-Whiskers-Plot. _____	36
Abbildung 4-8 mittlerer Tenascin-Score (mit Standardfehler) für Proben mit entsprechendem Mankin-Score. _____	37

Abbildung 4-9 Abhängigkeit des Mankin-Scores von der Anzahl der Rückstreumaxima; als Box-Whiskers-Plot. _____	38
Abbildung 4-10 Abhängigkeit der mittleren Impedanz des Knorpels der gelenkbinnenraumnahen Knorpelzone vom Punktwert der Kategorie I des Mankin-Scores; als Box-Whiskers-Plot. _____	39
Abbildung 4-11 Abhängigkeit der Impedanz vom Punktwert des Tenascin-Scores der Zone 1 (knochennahe Schicht) und der Zone 2 (mittlere Schicht). _____	40
Abbildung 4-12 Abhängigkeit der Impedanzen des Gesamtknorpels, der knochennahen Knorpelschicht und der mittleren Knorpelschicht vom Auftreten einer subchondralen Sklerosierung; als Box-Whiskers-Plot. _____	41
Abbildung 4-13 Abhängigkeit der Rauigkeit des Knorpel - Knochenübergangs vom Wert des Mankin-Score (gesamt); als Box-Whiskers-Plot. _____	41
Abbildung 4-14 Abhängigkeit der Knochenimpedanz vom Wert des Mankin-Score (gesamt); als Box-Whiskers-Plot. _____	42
Abbildung 4-15 Abhängigkeit der Impedanz im subchondralen Knochen in der Nähe der Knorpel - Knochengrenze vom Wert der Kategorie III des Mankin-Scores; als Box-Whiskers-Plot. _____	43
Abbildung 5-1 Vergleich der angewendeten Verfahren anhand einer stark degenerierten Probe. _____	51
Abbildung 5-2 Vergleich der angewendeten Verfahren anhand einer weniger stark degenerierten Probe. _____	53

---

## **TABELLEN**

Tabelle 1-1 makroskopische Klassifizierung der Knorpeldegeneration nach Outerbridge [20-22].....	8
Tabelle 3-1 Histologische Klassifizierung der Knorpeldegeneration (aus Mankin [51]). .....	27
Tabelle 3-2 Histologische Klassifizierung der Färbungen mit Tenascin-C Antikörpern.....	27
Tabelle 4-1 Mittelwert und Standardabweichung für die histologische Beurteilung nach dem Mankin-Score .....	37
Tabelle 4-2 F - Statistik und p-Werte des Tests auf Kolinearität.....	38

---

## SYMBOLLE

$\lambda$	Wellenlänge [m]
$c$	Schallgeschwindigkeit [ $\text{m s}^{-1}$ ]
$f$	Frequenz [Hz] = [ $\text{s}^{-1}$ ]
$R$	Reflexionskoeffizient
$Z$	Akustische Impedanz [rayl] = [ $\text{kg m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]
$T$	Transmissionskoeffizient
$\rho$	Dichte [ $\text{kg m}^{-3}$ ]
$TOF$	Time of Flight (Puls-Echo-Laufzeit) [s]
$AIB$	Apparent Integrated Backscatter [dB]
$x,y,z$	kartesische Koordinaten [m]. Die Schallstrahlachse ist üblicherweise auf der $z$ -Achse, $x$ und $y$ sind die dazu orthogonalen Richtungen. Bei einem C-Scan wird die Richtung der kontinuierlichen Bewegung als $x$ und die Richtung der schrittweisen Bewegung als $y$ bezeichnet.

---

## **GLOSSAR**

- B-Bild** Sukzessive Akquisition einer Folge von Puls-Echo-Signalen, wobei der Schallwandler in einer Richtung senkrecht zur Schallstrahlachse (d.h. in der Regel parallel zur Oberfläche der untersuchten Probe) bewegt wird. Die zweidimensionale Darstellung der Hüllkurven wird als B-Bild bezeichnet. Es entsteht ein akustisches Schnittbild.
- C-Bild** Der Wandler wird mäanderförmig in einer Ebene parallel zur Probenoberfläche geführt. Üblicherweise wird das Puls-Echo-Signal innerhalb eines wählbaren Zeitfensters (Gate) demoduliert und integriert, so dass pro Scanpunkt ein integraler Spannungswert zur Verfügung steht. Diese werden zu einem zweidimensionalen Grauwertbild zusammengesetzt. Im hier beschriebenen SAM100-System wird hingegen von jedem Scanpunkt das komplette Puls-Echo-Signal gespeichert.
- SAM** (= Scanning Acoustic Microscope) Das hier verwendete akustische Mikroskop SAM100 ist eine modifizierte Version des KSI SAM100 (Krämer Scientific Instruments, Herborn, Germany).

---

## 1 EINLEITUNG

Mit einer Inzidenz von 240/100 000 klinisch und radiologisch gesicherter Gonarthrosen stellt die Gonarthrose eine der weltweit häufigsten Gelenkerkrankungen dar [13,38,49]. Laut WHO befanden sich im Jahr 2000 den Verlust an Lebenszeit betreffend Erkrankungen des Bewegungsapparates an dritter Stelle nach koronaren Herzkrankheiten und zerebrovaskulären Erkrankungen. Die Osteoarthrose hatte unter den Erkrankungen des Bewegungsapparates den größten Anteil [13].

Sowohl die individuelle Beeinträchtigung des Patienten als auch sozioökonomische Belastungen sind erheblich. Untersuchungen in verschiedenen Ländern (u.a. USA, Kanada, Großbritannien, Frankreich, Australien) haben ergeben, dass sich die jährlich ökonomische Belastung durch Erkrankungen des Bewegungsapparates auf 1-2,5 % des Bruttosozialproduktes beläuft [13].

Die Inzidenz, die bei radiologischen Untersuchungen in verschiedenen Populationen Europas gefunden wurde, liegt je nach Untersuchung und Fallzahl für die Gonarthrose bei mindestens 1 % pro Jahr. Mehrere klinische Studien belegen, dass die Inzidenz für die Arthrose steigt [13].

Die Prävalenz nimmt mit dem Alter zu und schwankt für die Gonarthrose bei den über 45-jährigen im europäischen Raum je nach Studie und Patientenalter zwischen 2,9 und 60 %. Sie ist in allen Studien, in denen nach Geschlecht differenziert wurde, deutlich frauenwendig [13]. Aus der Rotterdam-Studie geht hervor, dass von 1040 Probanden im Alter von 55 bis 65 Jahren lediglich 135 keine radiologischen Zeichen einer Arthrose der Knie-, Hüft-, Wirbel- oder Handgelenke aufwiesen [33]. Da der Anteil älterer Menschen in der Bevölkerung Westeuropas beständig wächst, lässt dies erwarten, dass die Osteoarthrose eine zunehmende Belastung des Gesundheitssystems darstellen wird [13].

Epidemiologische Studien zur Arthrosehäufigkeit weisen sehr unterschiedliche Ergebnisse auf. Das liegt zum einen daran, dass die Beurteilung von Röntgenbildern vor allem in frühen Stadien nicht unproblematisch ist, zum anderen sind degenerative Veränderungen des Knorpels arthroskopisch nachweisbar bevor sie radiologisch nachzuvollziehen sind. Außerdem sind radiologisch gesicherte Arthrosen nicht unbedingt klinisch symptomatisch und Gelenkschmerzen nicht zwingend mit einer radiologisch verifizierbaren Arthrose assoziiert [13].

Für die Diagnostik der Arthrose stehen bildgebende Verfahren und klinisch anamnestische Parameter zur Verfügung. Spezifische Laborparameter sind nicht bekannt.

Nach KELLGREN et al. werden im konventionellen Röntgenbild vier Schweregrade der Arthrose definiert. So zeigen sich im Vollbild der Arthrose eine Aufhebung des Gelenkspaltes, osteophytäre Ausziehungen, eine subchondrale Sklerosezone und Geröllzysten [13,48-50]. Dies alles sind jedoch Spätzeichen einer Arthrose. Eine entsprechende Klassifizierung der Arthrose auf Basis der Befunde in der Magnetresonanztomographie hat sich noch nicht durchgesetzt [48]. Auch mit anderen bildgebenden Verfahren wie der Computer- und Magnetresonanztomographie können zwar die Dicke und das Volumen des Knorpels bestimmt [12], jedoch keine frühen Knorpelschäden dargestellt werden [5,12].

Therapeutisch lässt sich ein Fortschreiten der Arthrose kaum verzögern. Es können lediglich Symptome therapiert werden [48] (siehe **1.2**). Zum Zeitpunkt, an dem mit herkömmlichen Verfahren eine Arthrose diagnostiziert werden kann, kommt in vielen Fällen nur noch der alloplastische Gelenkersatz als Therapie in Frage [48]. Daher besteht die substantielle Notwendigkeit, Methoden der Früherkennung zu finden, die Grundlage für die Entwicklung einer Therapie im Frühstadium bieten.

### **1.1 Knorpel**

#### **1.1.1 Aufbau**

Gelenkknorpel besteht aus hyalinem Knorpel. Der hyaline Knorpel ist die häufigste Knorpelart. Als weitere Knorpelarten sind der elastische und der Faserknorpel zu nennen. Die Unterscheidung wird anhand der unterschiedlichen Zusammensetzung der Interzellulärsubstanz getroffen. Die Bezeichnung des hyalinen Knorpels entstammt dem griechischen „hyalin“ (durchscheinend). Hyaliner Knorpel setzt sich aus Wasser (60-80 %), der Knorpelmatrix (Interzellulärsubstanz) und den Knorpelzellen (Chondrozyten) zusammen und kommt in der Trachea, den Bronchien, dem Kehlkopf, der Nase, den Rippen, als Skelettanlage und im ausgereiften Skelett als Gelenkknorpel vor. Der pH-Wert des Knorpels liegt bei 7,2 [34].

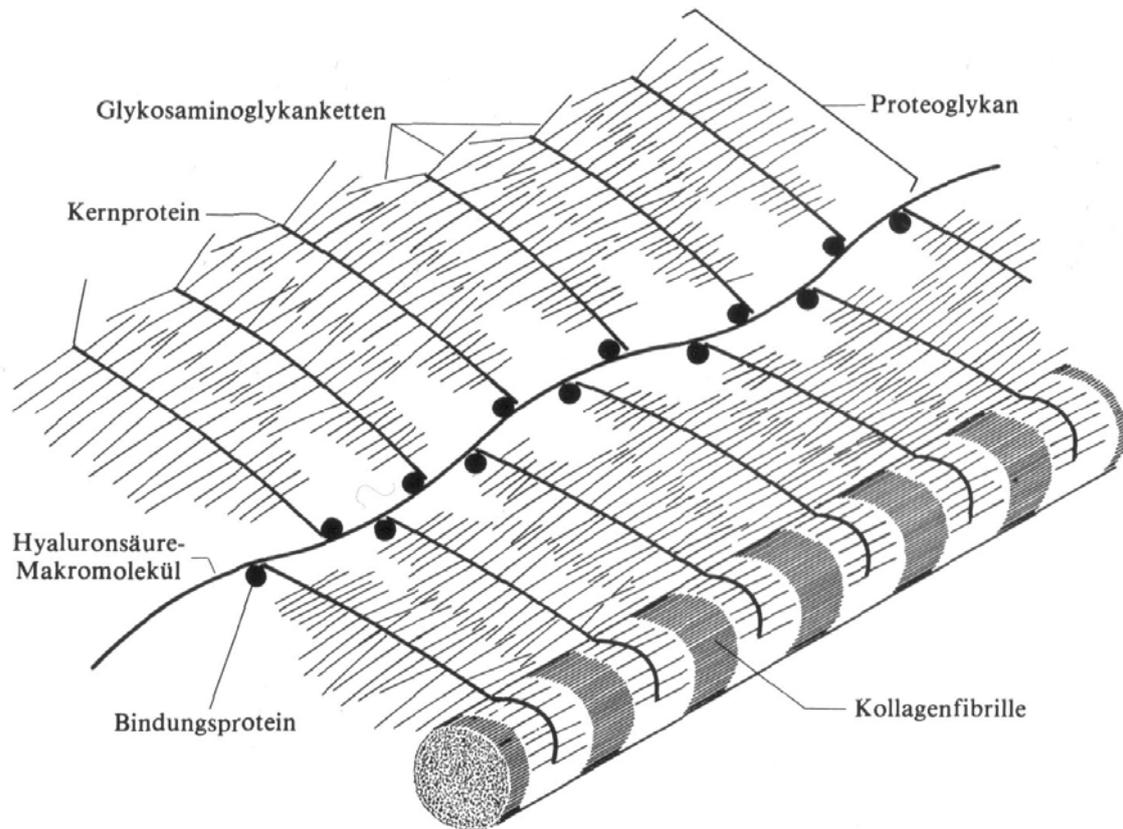
Nur 1-10 % der Gesamtmasse des Knorpels wird von Chondrozyten eingenommen. Sie sind bis zu 30 µm groß und der einzige lebende Bestandteil des Knorpels. Sie sind mit Enzymen (z.B.: verschiedene Katalasen, saure Phosphatase, Metalloproteasen, Lysozym, Kollagenase [34]) ausgestattet, die für die Synthese und den Abbau der interzellulären Matrix verantwortlich sind. Bis zu 10 Zellen lagern sich zu sogenannten Chondronen zusammen. Lichtmikroskopisch scheinen die Chondrozyten in Höhlen zu liegen. Es ist anzunehmen, dass der Wasser- und Matrixverlust bei der histologischen Aufarbeitung Ursache für diese Höhlenbildung ist [34]. Chondrozyten sind mesenchymalen Ursprungs. Ihre Tätigkeit wird

endokrin beeinflusst. Thyroxin und Testosteron steigern, Cortison und Östrogene hemmen ihre Tätigkeit.

Die Interzellulärsubstanz (Knorpelmatrix) besteht aus Kollagenfasern (50 % des Trockengewichts des Knorpels), Proteoglykan-Hyaluronsäurekomplexen (10 % d. Tr.) und Wasser. Der Anteil des Kollagens und der Proteoglykane in der Knorpelmatrix variiert ortsabhängig (siehe **3.5**). Das Verhältnis von Kollagen zu Glykanen bestimmt die elastischen Eigenschaften des Knorpels und liegt in gesundem Knorpel bei 1:1 [36].

Kollagen ist ein Eiweiß und organischer Bestandteil beispielsweise von Knochen, Zähnen, Sehnen, Bändern und Haut. Kollagenfasern besitzen eine enorme Zugfestigkeit und sind nicht dehnbar. Seinen Namen erhielt das Kollagen aus dem Griechischen „Leim erzeugend“ aufgrund seiner früheren Nutzung als Knochenleim. Es sind fast 30 Kollagenarten bekannt. Gelenkknorpel besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ-II. Er enthält nur geringe Anteile anderer Kollagenarten. Die Menisken als weitere Bestandteile des Kniegelenks bestehen dagegen aus Faserknorpel, dessen Hauptbestandteil das Kollagen Typ-I darstellt. Der höchste Kollagengehalt liegt im gelenknahen Knorpel vor; zur Tiefe hin nimmt der Gehalt ab. Die perizelluläre Matrix besteht überwiegend aus Kollagen Typ-V. Vom biomechanischen Gesichtspunkt sorgen die Kollagenfibrillen für die hohe dynamische Kompressionsfestigkeit des Knorpels (siehe **1.1.2**).

Die Proteoglykane der Knorpelmatrix (Molekulargewicht ca. 1-2 Mio. D) setzen sich aus den Glykosaminoglykanen Chondroitinsulfat und Keratansulfat (= Mucopolysaccharide bestehend aus Disacchariden aus einem acetylierten Aminozucker (z.B. Glucosamin, Galaktosamin) und aus Uronsäure (Glucuron-, Iduronsäure) bzw. Glucose (Keratansulfat)) zusammen, die über ein Bindungsprotein mit Hyaluronsäure zu einem Proteoglykan-Hyaluronsäurekomplex (Molekulargewicht: 50-100 Mio. D) verbunden sind [42]. Diese Komplexe sind wiederum an die Kollagenfibrillen gebunden (siehe **Abbildung 1-1**). Ihre Biosynthese im endoplasmatischen Retikulum wird durch Androgene und Wachstumshormon gesteigert und durch Glucocorticoide und Insulinmangel gehemmt [42]. Die Proteoglykanaggregate sind negativ geladen und stark hydrophil (siehe **1.1.2**).



**Abbildung 1-1** Schematische Darstellung eines Proteoglykan-Hyaluronsäurekomplexes gebunden an eine Kollagenfibrille (aus [6]).

Der Mengenanteil aller Proteoglykane nimmt von der Oberfläche des Knorpels zur Tiefe hin zu, umgekehrt zum Kollagengehalt. Der höchste Chondroitinsulfatgehalt liegt in der mittleren Knorpelzone und nahe der Chondrozyten vor. Der Keratansulfatgehalt steigt mit der Entfernung zur Oberfläche und den Chondrozyten in der interzellulären Matrix. In biochemischen Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass der Umsatz der Proteoglykane alters- und speziesabhängig ist [34]. Die Halblebenszeit der Proteoglykane wird auf einige Tage geschätzt. MANKIN et al. (1978) fanden beispielsweise eine Subfraktion, die 5-10 % ausmacht und deren Halblebenszeit 8 Tage beträgt [34]. Der Umsatz der Proteoglykane ist verantwortlich für die Stabilität und Elastizität des Knorpels (siehe **1.1.2**).

Sowohl licht- und polarisationsmikroskopisch als auch bei biochemischen Analysen zeigt gesunder hyaliner Gelenkknorpel einen dreischichtigen Aufbau. Die junge und völlig gesunde Knorpeloberfläche wird zum Gelenkbinnenraum hin von einer dünnen vierten Schicht, der sogenannten Lamina splendens, bedeckt. Es wird angenommen, dass sie aus einem Netzwerk feinsten Kollagenfilamente mit adsorbierter Hyaluronsäure besteht [34].

In der obersten (gelenknahen) Schicht sind die Kollagenfasern parallel zur Knorpeloberfläche angeordnet (polarisationsmikroskopisch zu erkennen) und haben eine Dicke zwischen 10 und 34 nm. Die Knorpelzellen haben eine horizontal abgeplattete Form. Eine Desquamation der oberflächlichen Zellschicht wie bei der Epidermis findet offensichtlich nicht statt, da in der Synovia keine Knorpelzellen zu finden sind [34].

In der mittleren Schicht zeigen die Kollagenfasern polarisationsmikroskopisch einen eher ungeordnet erscheinenden Verlauf (es sind alle Richtungen zu erkennen). Die Kollagenfasern werden hier allmählich dicker und die Chondrozyten haben eine kugelige Form.

In der knochennahen Knorpelschicht zeigen die hier bis zu 100 nm dicken Kollagenfasern polarisationsmikroskopisch einen deutlich radiären Verlauf, so dass über die gesamte Fläche des Knorpels von der Knorpel - Knochengrenze bis zur Oberfläche ein arkadenartiges Erscheinungsbild der Fasern imponiert [34,37].

### 1.1.2 Funktion

Knorpel bedeckt die Flächen des Gelenks, welche sich bei der Artikulation gegeneinander bewegen und dient somit dem reibungslosen Ablauf der Bewegung. Eine wichtige Voraussetzung für eine optimale Funktion ist eine möglichst glatte und unversehrte Knorpeloberfläche. Normalerweise ist Knorpel von einer schützenden, ernährenden und regenerativen Knorpelhaut (Perichondrium) umgeben. Dem Gelenkknorpel fehlt das Perichondrium; seinen funktionellen Ansprüchen entsprechend ist er dadurch glatt, hat jedoch keine Möglichkeit, sich zu regenerieren. Die bisherige Meinung, dass Knorpelzellen mit Abschluss der Wachstumsphase ihre Teilungsfähigkeit verlieren, muss relativiert werden [34]. Eine Heilung des Knorpelgewebes im Sinne einer restitutio ad integrum ist dennoch nicht möglich. Das bedeutet, dass bei Erwachsenen einmal beschädigter Knorpel nicht mehr vollständig regeneriert werden kann. Im Falle einer Verletzung wird Narbengewebe aus Faserknorpel (Kollagen Typ-I) gebildet, der nicht auf die mechanischen Belastungen im Gelenk ausgelegt ist.

In vivo ist der Knorpel zum Gelenkbinnenraum hin von Synovia (Gelenkflüssigkeit) umgeben. Die Synovia wird von den Synovialzellen, die die Gelenkkapsel von innen auskleiden, gebildet. Sie stellt ein Filtrat des Blutplasmas dar, dem Produkte der Synovialzellen beigemischt werden. Von besonderer Bedeutung sind als Synovialzellprodukte die Glykosaminoglykane (v.a. Hyaluronsäure; ca. 1-2 % der Synovia), die für ihre hohe Viskosität verantwortlich sind. Sie optimieren quasi als „Gelenkschmiere“ die Gleiteigenschaften der Knorpeloberfläche und halten den Knorpel durch ihre osmotische

Wirkung in einem konstanten Quellungszustand. Dadurch kann er den funktionellen Ansprüchen, die an ihn gestellt werden, optimal gerecht werden.

Da Knorpel ein bradytrophes Gewebe ist, also nicht durchblutet wird, und über einen geringen Stoffwechsel verfügt, ist er auf andere Möglichkeiten der Versorgung mit Nährstoffen angewiesen. Diese Aufgabe erfüllt ebenfalls die Synovia als Plasmafiltrat. Durch die intermittierende Belastung des Knorpels bei Bewegung (Belastung – Entlastung) findet ein Austausch von Flüssigkeit zwischen Gelenkbinnenraum und Knorpel und eine Diffusion von Nährstoffen in den Knorpel statt. Die Diffusionstiefe beträgt nach UEHLINGER et al. 5-6 mm [34].

Die biomechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels werden durch ein dreidimensionales Netzwerk aus Kollagenfasern, die dort angelagerten negativ geladenen Glucosaminoglykanen und das im Gewebe gebundene Wasser bestimmt. Während das Kollagenetzwerk eine hohe dynamische Kompressionsfestigkeit bewirkt, beeinflussen die Glucosaminoglykane maßgeblich die statischen mechanischen Eigenschaften durch ihre elektrostatische und osmotische Funktion [3,25,35,36].

Bei der Arthrose kommt es schon in einem frühen Stadium - bevor ein Verlust an Knorpelsubstanz eintritt - zu einer Zerstörung des Kollagenetzwerks und zu einer Verschiebung des Kollagen-Glykanverhältnisses zu Gunsten des Kollagens. Trotzdem nimmt der Knorpel mehr Wasser auf, da das Kollagenetzwerk, das sonst die Quellung beschränkt, zerstört ist. Der Knorpel wird dadurch weicher und verliert an Festigkeit. Die mittlere Schicht des Knorpels quillt am stärksten, da sie den höchsten Gehalt an Glykosaminoglykanen hat (siehe 1.1.1) [34-36]. Der Wassergehalt des Knorpels kann um bis zu 60 % zunehmen [7].

## 1.2 Arthrose

Synonyme: Arthrosis deformans, Osteoarthrose, degenerative Arthropathie; angloamerikanisch: Osteoarthritis, degenerative Arthritis

### 1.2.1 Definition

Die Bezeichnung "Arthrosis deformans" oder "Arthrose" kennzeichnet eine letztlich in ihrer Ätiologie ungeklärte, irreversible, langsam progrediente, primär nicht entzündliche, degenerative Veränderung der Knorpel- und Knochenstruktur eines oder mehrerer Gelenke mit zunehmender Gelenkdeformierung. Betroffen sind vor allem gewichtsbelastete Gelenke und Gelenke im Handbereich. Neben der knöchernen Gelenkdeformierung ist sie klinisch durch den sogenannten Anlauf- und Belastungsschmerz, endgradige zunehmende Bewegungseinschränkung, Krepitation und eine intraartikuläre Ergussbildung charakterisiert.

Abhängig vom aktuellen Beschwerdeausmaß werden die Termini "aktivierte" bzw. "dekompensierte Arthrose" für den Zustand der akuten Beschwerdesymptomatik mit Gelenkschwellung und "stumme" bzw. "kompensierte Arthrose" für den Zustand der degenerativen Gelenkveränderung ohne aktuelle Beschwerdesymptomatik verwendet [17,37].

Im deutschen Sprachraum konzentriert sich der Blick auf das degenerative Geschehen (Arthrose), während im angloamerikanischen Sprachraum die klinische Symptomatik im Vordergrund steht (Osteoarthritis).

### 1.2.2 Ätiologie

Man unterscheidet eine primäre Form im Sinne einer idiopathischen Genese und verschiedene sekundäre Formen.

Bei der primären Form ist die Ätiologie unklar. Bei den sekundären Formen liegen kongenitale oder erworbene Veränderungen vor, die zur Arthrose führen. Hierzu zählen z.B. Achsabweichungen des Skelettes, Immobilisation, Gelenkentzündungen und -einblutungen, Knochenkrankheiten (z.B. M. Paget, Osteonekrose), Stoffwechselstörungen einschließlich endokriner Erkrankungen (z.B. Diabetes) [17].

Es werden viele Risikofaktoren für die Arthrose diskutiert. Die Adipositas zählt unabhängig von Geschlecht und ethnischer Zugehörigkeit zu den gut dokumentierten Risikofaktoren für die Gonarthrose [15,24].

Diese Arbeit soll sich ausschließlich auf die primäre Form der Arthrose konzentrieren.

### 1.2.3 Pathogenese

Der formale Ablauf der Veränderungen der Gelenkstrukturen bei der Arthrose ist weitgehend bekannt. Zu Beginn findet eine Erweichung der Knorpelmatrix statt, der horizontale und vor allem vertikale Knorpelfissuren folgen. Der Knorpel wird durch die mechanische Belastung immer weiter abgetragen. Bei der Zerstörung des Knorpelgewebes kommt es zur Freisetzung von Enzymen aus den Knorpelzellen (Proteasen, Kinine). Diese tragen zum Knorpelabbau bei und induzieren zugleich eine Entzündung der Synovialmembran (Synovialitis). Durch die Entzündung verschlechtert sich die Ernährungssituation des Knorpels und die Kapsel schrumpft. Dies verursacht eine zunehmende Bewegungseinschränkung und Deformierung des Gelenks. Es resultiert ein Circulus vitiosus, der schließlich zum völligen Abbau der intraartikulären Knorpelsubstanz und zur kompletten Freilegung des subchondralen Knochens (Eburnisation) führt.

Röntgenmorphologische Veränderungen sind nach KELLGREN et al. [13,48-50,50] die Verkleinerung des Gelenkspaltes durch den fortschreitenden Knorpelabbau, eine

subchondrale Sklerosezone, die Ausbildung gelenknaher Knochenzysten und Osteophyten, da auch die Knochenstrukturen des Gelenkes in den Prozess der Arthrose einbezogen sind. Die Sklerosezone und die osteophytären Ausziehungen bilden sich aufgrund der erhöhten Belastung der durch den Verlust an Knorpelmasse veränderten Schub- und Scherkräfte, die auf den subchondralen Knochen wirken. Durch Einbrüche der sklerosierten Deckplatte entstehen Zysten. Die röntgenmorphologischen Zeichen der Arthrose gehen jedoch nicht immer mit einer entsprechenden klinischen Symptomatik einher [37].

### 1.2.4 Klassifikation

Es gibt viele verschiedene Klassifikationsschemata für die Beurteilung eines Knorpelschadens. Im klinischen Gebrauch hat sich die Klassifizierung nach OUTERBRIDGE et al. (1961) [14,39] durchgesetzt. Der Grad der Schädigung wird während der Arthroskopie durch Betasten der Knorpeloberfläche mit einem Tasthaken in allen Kompartimenten des Gelenks festgestellt. OUTERBRIDGE differenziert vier Grade der Knorpelschädigung (siehe **Tabelle 1-1**).

**Tabelle 1-1** makroskopische Klassifizierung der Knorpeldegeneration nach Outerbridge [14,39].

<b>Defekt</b>	<b>Grad</b>
<b>Normaler Knorpel</b>	<b>0</b>
<b>Erweichung und Schwellung bei intakter Oberfläche</b>	<b>1</b>
<b>Oberflächliche Fissurenbildung</b>	<b>2</b>
<b>Tiefe Risse</b>	<b>3</b>
<b>Freilegung des subchondralen Knochens (Eburnisation)</b>	<b>4</b>

Röntgenmorphologisch wird die Arthrose nach KELLGREN et al. [13,48-50] ebenfalls in vier Stadien eingeteilt.

### 1.2.5 Therapie

Die Arthrose ist ein fortschreitendes Krankheitsgeschehen, das nicht kausal therapiert werden kann. Es werden symptomatisch Schmerztherapien, entzündungshemmende Maßnahmen sowie Physiotherapie (v.a. Kräftigung des M. quadrizeps femoris) angewendet [24]. Eine intraartikuläre Substitution der Gelenkflüssigkeit bringt nur eine vorübergehende Beschwerdebesserung [14]. All diese Maßnahmen sind rein symptomatisch und verhindern nicht den fortschreitenden Abbau der Knorpelsubstanz.

So genannte Chondroprotektiva (Glucosamine und Chondroitin als Nahrungsergänzungsmittel) sind äußerst umstritten und zeigten sich in aktuellen Studien im Hinblick auf die Schmerzreduktion einem Placebo nicht überlegen [11].

Bei lokal umschriebenen Knorpeldefekten (posttraumatisch oder im Rahmen einer Osteochondrosis dissecans) kann eine Knorpel-Knochen transplantation oder autologe Chondrozytentransplantation erwogen werden. Diese setzt jedoch einen gesunden, nicht sklerosierten osteochondralen Übergang voraus und bleibt somit Patienten mit einem lokal begrenzten Knorpelschaden ohne Generalisierung oder stattgehabten Adaptationsvorgänge wie die subchondrale Sklerosierung vorbehalten.

Die Arthroskopie stellt den Standard zur Kniebinnendiagnostik bei unklaren Gelenkbeschwerden dar. Sie bietet den Vorteil, dass Diagnostik und Therapie bei einer Minimierung des OP-Traumas in einem Eingriff durchgeführt werden können. Die postoperative Krankheitsphase ist im Vergleich zur Arthrotomie wesentlich kürzer; die volle Gelenkfunktion wird schneller wieder erreicht. Die Arthroskopie wird heute in vielen Fällen ambulant durchgeführt. Sie stellt ein schnell durchführbares, wenig belastendes Verfahren mit geringer Komplikationsrate dar. Dennoch handelt es sich um ein invasives Verfahren. Als Standardverfahren für die arthroskopische Knorpelbehandlung hat sich das Débridement in Verbindung mit einer Lavage etabliert (auch als "Gelenktoilette" bezeichnet). Unter dem Débridement werden alle Maßnahmen subsumiert, die zu einem besseren Bewegungsablauf der Gelenkflächen beitragen. Neben der Knorpelglättung mit einer Fräse oder mittels Laser, Osteophytenabtragung, der Entfernung flottierender Knorpelteile und freier Gelenkkörper wird hierzu auch die Resektion geschädigter Meniskusanteile und die Synovektomie (Entfernung der Innenhaut der Gelenkkapsel) gezählt. Mit der anschließenden Lavage soll Detritus und damit enzymatisch aktives Gewebe entfernt werden, das eine Entzündung des Gelenks auslösen oder eine bestehende Entzündung unterhalten kann [17]. Es muss jedoch betrachtet werden, dass das arthroskopische Débridement lediglich eine mechanische

Behandlung der Knorpeloberfläche darstellt und eine Progredienz der Arthrose nicht verhindern kann [17].

Eine weitere Möglichkeit der Behandlung unter der Arthroskopie besteht in der Pridie-Bohrung, in der die subchondrale Platte mit dem Ziel der Einblutung und Bildung von Faserknorpel aus hämatogenen Fibroblasten angebohrt wird. Über die mechanische Stabilität dieses Ersatzgewebes besteht Uneinigkeit [14].

Bei extremen Fehlstellungen kann eine Umstellungsosteotomie versucht werden, um das Fortschreiten der Knorpeldestruktion hinauszuzögern.

Die Tatsache der Regenerationsunfähigkeit des humanen Gelenkknorpels ist trotz gegenteiliger Ergebnisse in wiederholten tierexperimentellen Untersuchungen (vorzugsweise am Kaninchen) unumstößlich [14,17] somit bleibt als letzte Möglichkeit nur der alloplastische Gelenkersatz.

### 1.3 Grundlagen Ultraschall

Als Ultraschall werden mechanische Wellen bezeichnet, die oberhalb der menschlichen Hörschwelle (ca. 20 kHz) liegen. Bei den in der bildgebenden Diagnostik verwendeten Ultraschallwandlern wird eine piezoelektrische Keramik mit kurzen Stromimpulsen angeregt. Die Keramik verformt sich unter der Spannung und emittiert einen kurzen Schallimpuls. Beim Puls-Echo Verfahren wandelt dieselbe Keramik auch die zurückreflektierten bzw. gestreuten Ultraschallwellen wieder in elektrische Impulse um. Diese elektrischen Signale können dann zu einer bildlichen Darstellung oder auch zu einer quantitativen Auswertung verwendet werden.

Das Auflösungsvermögen eines akustischen Bildgebungssystems wird durch die Wellenlänge  $\lambda$  bestimmt. Diese hängt sowohl von der Frequenz  $f$  als auch von der Ausbreitungsgeschwindigkeit  $c$  der Welle im Medium ab:

$$\lambda = \frac{c}{f}. \quad (1-1)$$

Trifft die Welle senkrecht auf eine Grenzfläche zweier Materialien, so wird ein Teil der eingestrahnten Welle reflektiert, ein Teil dringt in die Struktur ein. Reflexions- und Transmissionskoeffizienten  $R$  und  $T$  ergeben sich aus den akustischen Impedanzen  $Z$  der beiden Stoffe.

$$R = \frac{Z_2 - Z_1}{Z_2 + Z_1} \quad (1-2)$$

$$T = \frac{2 \cdot Z_2}{Z_2 + Z_1} \quad (1-3)$$

Die Indizes kennzeichnen den Übergang vom Medium 1 in Medium 2. Die akustische Impedanz ist eine Materialkenngröße und ergibt sich aus dem Produkt von Schallgeschwindigkeit  $c$  und Massendichte  $\rho$ .

$$Z = \rho \cdot c \quad (1-4)$$

Üblicherweise wird die Einheit Mrayl (Megarayl) verwendet ( $1 \text{ rayl} = 1 \text{ kg m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

Analog zur Optik hängt das Auflösungsvermögen (der minimale Abstand zweier punktförmiger Objekte, die gerade noch getrennt voneinander wahrgenommen werden können) von der verwendeten Apertur und der Wellenlänge ab. Die Wellenlänge ist in einem bestimmten Medium nach Gleichung (1-1) eine Funktion der Frequenz. Strukturen können mit einem akustischen bildgebenden System aufgelöst werden, wenn sie größer als die Wellenlänge sind. In diesem Fall wird ein Teil der Welle an der Strukturgrenze reflektiert. Ist die Struktur vergleichbar oder kleiner als die Wellenlänge, dann wird ein Teil der einfallenden Welle an der Struktur gestreut.

Das Charakteristikum der Streuung ist abhängig von der Frequenz der einfallenden Welle und der Größe, der Geometrie, sowie dem Abstand und der Verteilung der Streuer. Durch diese Einflüsse ändert sich das Frequenzspektrum der gestreuten Wellen.

Die Eindringtiefe des Schalls sinkt mit zunehmender Frequenz, da die Dämpfung der Wellen in den meisten Materialien mit dem Quadrat der Frequenz steigt.

In der Praxis muss daher immer ein Kompromiss zwischen Eindringtiefe und dem erreichbaren Ortsauflösungsvermögen geschlossen werden. Experimentelle *in vitro* Untersuchungen bieten den Vorteil, das Gewebe direkt ohne vorgelagerte Schichten untersuchen zu können. Dies erlaubt die Verwendung von Frequenzen bis in den GHz-Bereich. Damit lassen sich subzelluläre Strukturen untersuchen.

---

## 2 ZIELSTELLUNG

Hochfrequente Ultraschalltechniken haben das Potential, minimalinvasiv frühe Gewebeveränderungen mit einer hohen örtlichen Auflösung darzustellen, ohne das Untersuchungsmaterial zu beschädigen. Mehrere Arbeiten haben sich mit der Charakterisierung einer künstlich erzeugten Arthrose (Zymosan-induziert) am Tiermodell (Ratte) [8,9] und der Charakterisierung gesunden Gelenkknorpels ebenfalls am Tiermodell (Kalb, Schwein) beschäftigt [18,19]. SAIED et al. [46,47] konnten mit dieser Methode am gleichen Modell neben der für die Arthrose charakteristischen Änderungen im Knorpel und an der Knorpeloberfläche die subchondrale Sklerosierung als weiteren Arthroseparameter darstellen. Untersuchungen an humanen Proben beschränken sich jedoch auf die Charakterisierung der Oberflächenveränderungen des Knorpels in verschiedenen Arthrostadien [1] bzw. der Bestimmung der Knorpeldicke [26].

Mit den bisher angewandten Methoden lassen sich Knorpeldicke, Schallgeschwindigkeit, Dämpfungs- und Streuparameter sowie deren Änderung bei Arthrose bestimmen [16,20,23,26-28,31]. Eine Zuordnung dieser Parameter zu bestimmten Strukturen oder deren pathologischen Veränderungen ist bisher nur rein empirisch am Tiermodell erfolgt. Der hochfrequenten Ultraschallmikroskopie wird jedoch in dieser Hinsicht eine hohe Potenz zugesprochen [16].

Prinzipiell erlaubt das Untersuchungsprinzip nach dem klassischen B-Bild Verfahren (akustisches Schnittbild) eine minimalinvasive in vivo Anwendung während der Arthroskopie. Für eine zuverlässige Interpretation der gewonnenen Parameter ist allerdings ein besseres Verständnis der komplexen Wechselwirkung zwischen Ultraschallwellen und Gewebsstrukturen notwendig.

Mit dem in dieser Arbeit unter **3.4** vorgestellten C-Bild Verfahren (SAM) am sagittal geschnittenen nativen Präparat sollte die Möglichkeit untersucht werden, mikroelastische Messungen in mikroskopischer Auflösung am Knorpel und subchondralen Knochen durchzuführen und gleichzeitig mechanische Parameter für die einzelnen Arthrosezeichen wie Oberflächenrauigkeit, subchondrale Sklerosierung und die Veränderung der akustischen Eigenschaften innerhalb der Knorpelmatrix zu bestimmen und diese orts aufgelöst den entsprechenden Gewebsstrukturen zuzuordnen [30]. Es soll ein besseres Verständnis für die im klinischen Alltag prinzipiell während der Arthroskopie anwendbare B-Bild Technik, die unter **3.3** vorgestellt wird, gewonnen werden [44]. Frühe Arthrosezeichen sollen erkennbar werden, um damit die Option auf die Entwicklung einer entsprechend frühzeitigen Therapie zu haben.

---

## **3 MATERIAL UND METHODEN**

### **3.1 Probengewinnung**

Für die Versuchsdurchführung wurden 28 bei der Knieendoprothetik anfallende Operationsresektate humaner Tibiaplateaus aus der Klinik für Orthopädie und Physikalische Medizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg verwendet. Da bei allen Patienten die Indikation für einen alloplastischen Gelenkersatz gestellt worden war, handelte es sich bei den entnommenen Resektaten um Präparate, die eine sehr starke Knorpeldestruktion bei weit fortgeschrittener Arthrose aufwiesen. Andere Ursachen als eine primäre Arthrose als Indikation für den Gelenkersatz – wie beispielsweise die rheumatoide Arthritis – wurden ausgeschlossen. Hinzu kam als Kontrollprobe das Tibiaplateau eines 17-jährigen männlichen Spenders, das im Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg entnommen wurde. Diese Kontrollprobe wies keinerlei Zeichen einer Arthrose auf.

Patientendaten wie Alter oder Geschlecht wurden nur für die Proben, die ausschließlich am akustischen Mikroskop SAM (siehe **3.4** und **4.2**) gemessen wurden, ermittelt. Um geschlechtsspezifische Einflüsse auszuschließen, wurden hier nur Resektate von weiblichen Personen untersucht. Das Alter der Patientinnen bei Entnahme lag zwischen 45 und 78 Jahren mit einem Mittelwert von  $66,1 \pm 5,1$  Jahren. Es handelte sich für um 13 Resektate, die nur mit dem SAM untersucht wurden. Hinzu kamen 15 Resektate, die mit dem SAM untersucht wurden, nachdem zuvor Rückstremessungen (siehe **3.3** und **4.1**) vorgenommen worden waren. Für diese Proben wurden keine Patientendaten aufgenommen.

### **3.2 Probenpräparation**

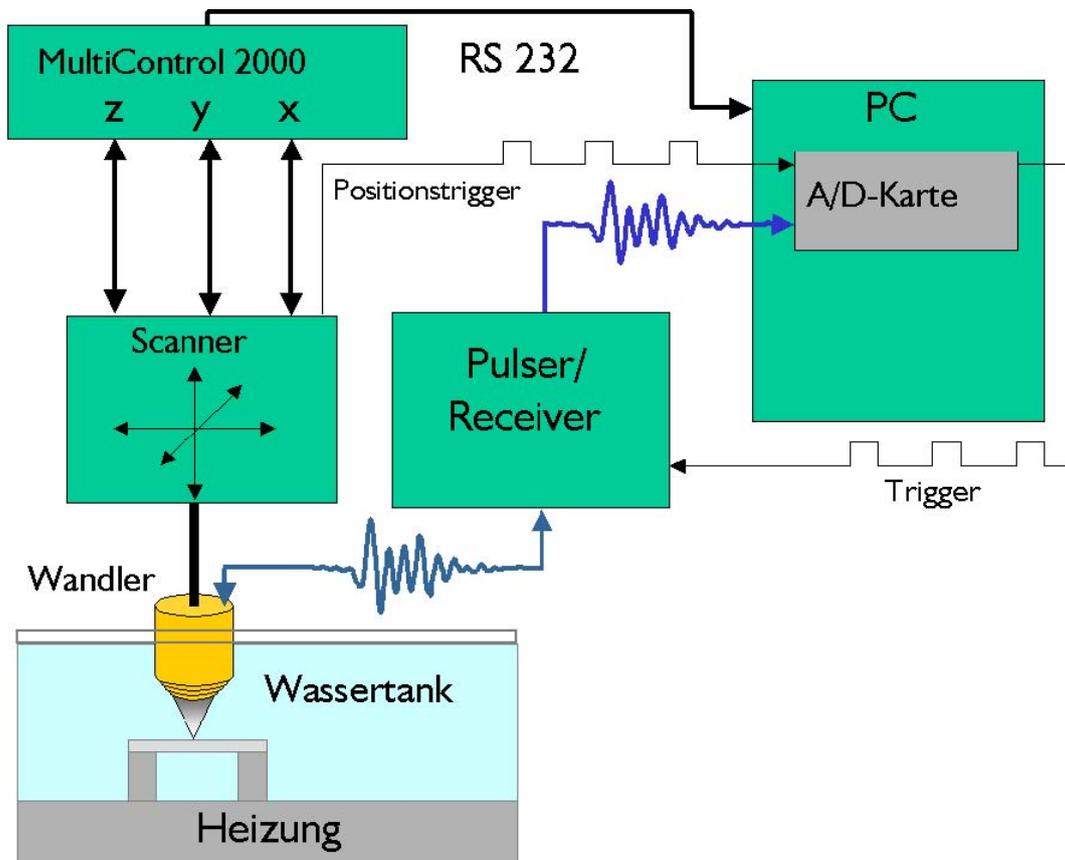
Die Proben wurden sofort nach der Entnahme nativ bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verarbeitung tiefgekühlt und jeweils direkt vor den Messungen präpariert. Die Präparationsschritte werden direkt am Beginn des jeweiligen Abschnittes erläutert.

Es wurden Rückstremessungen nach dem B-Bild Verfahren (siehe **3.3**), Untersuchungen am akustischen Mikroskop SAM nach dem C-Bild Verfahren (siehe **3.4**) und eine histologische Klassifizierung (siehe **3.5**) durchgeführt.

### **3.3 Rückstremessung (B-Bild Verfahren)**

Für die Rückstremessungen wurden 15 der 28 Tibiaplateaus verwendet. Die Messungen wurden am Laboratoire d'Imagerie Paramétrique an der Universität Pierre et Marie Curie in Paris durchgeführt. Die Tibiaplateaus wurden dafür in physiologischer NaCl-

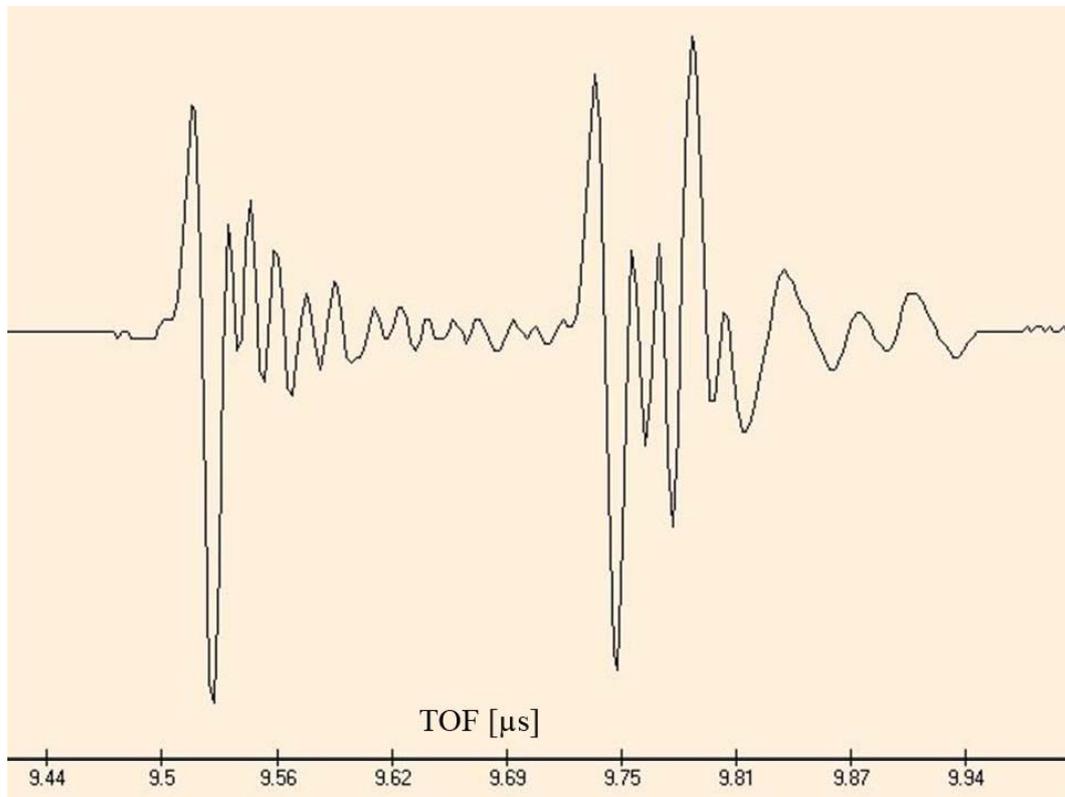
Lösung aufgetaut; Weichgewebe und Menisci wurden entfernt (siehe **Abbildung 3-4**). Für die Gewinnung der Rückstreuparameter wurden die Tibiaplateaus in entgaster physiologischer NaCl-Lösung als Kopplungsmedium bei Raumtemperatur mit einem fokussierenden 80 MHz-Wandler (Krautkramer Foertser Co Ltd, Tokyo, Japan) untersucht, der durch eine Klarsichtfolie vor Verschmutzungen geschützt wurde. Das axiale und laterale Auflösungsvermögen im Fokus des Wandlers (bei 7,5 mm) betragen 30  $\mu\text{m}$  und 60  $\mu\text{m}$  [8]. Die Funktionsweise des Wandlers entspricht der des Puls-Echo-Verfahrens, das in Abschnitt 1.3 erläutert wurde. Der prinzipielle Messaufbau ist in **Abbildung 3-1** dargestellt.



**Abbildung 3-1** Prinzipieller Messaufbau der verwendeten Mikroskope (aus [43]).

Die Proben wurden in den Tank mit dem Kopplungsmedium eingebracht und die Probenoberfläche durch Justieren des Probentisches so ausgerichtet, dass sie möglichst rechtwinklig zum einfallenden Schallstrahl lag. Die Richtung des einfallenden Schallstrahls entsprach somit annähernd der Längsachse des Unterschenkels. Der Schallwandler wurde so positioniert, dass die Fokusebene etwas unterhalb der Knorpeloberfläche lag. **Abbildung 3-2** zeigt ein typisches Puls-Echo Signal. Registriert wird das Puls-Echo-Signal in Abhängigkeit von der Laufzeit (Time Of Flight, TOF). Zu sehen ist das Reflexionsecho von der

Knorpeloberfläche bei 9,5  $\mu\text{s}$ , direkt danach mehrere Streusignale und die Reflexion von der Knochenoberfläche bei 9,75  $\mu\text{s}$ .



**Abbildung 3-2** Typisches Puls-Echo Signal mit Reflexion von der Knorpeloberfläche (9,5  $\mu\text{s}$ ), Streusignalen und der Reflexion von der Knochenoberfläche (9,75  $\mu\text{s}$ ).

Es wurde zuerst eine Übersichtsmessung zur groben Orientierung angefertigt (**Abbildung 4-1**), in der die Knorpeloberfläche von dorsal nach ventral in der Sagittalebene gescannt wurde. Es wurden dazu jeweils drei medial und drei lateral gelegene Linien analog zum Vorgehen bei den SAM-Messungen (siehe **Abbildung 3-4**) gewählt. Die Linien, entlang derer die Daten gewonnen worden waren, wurden jeweils mit wasserfestem Stift markiert, um bei den Messungen am SAM Daten aus denselben Regionen gewinnen zu können.

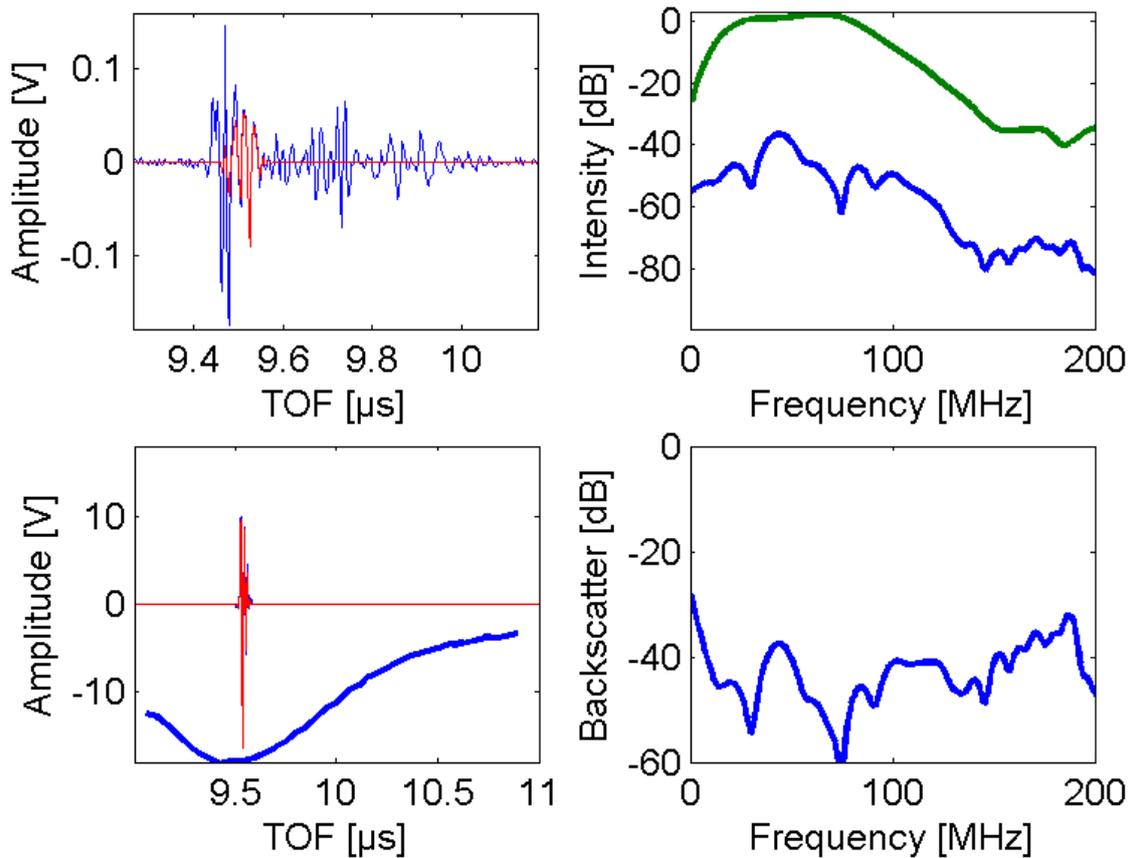
Anhand der Übersichten konnten die Oberflächenbeschaffenheit und die Knorpeldicke bestimmt und geeignete Felder für eine detailliertere Messung zur Bestimmung der tiefenabhängigen spektral integrierten Rückstreuamplitude AIB (Apparent Integrated Backscatter in dB) nach der von SAIED et al. [8,9,22,39,40] entwickelten Methode ermittelt werden.

Pro Übersichtsscan wurden ein bis drei Ausschnitte in einer Größe von 0,4 mm x 2 mm gewählt, über die der Wandler in Schritten entlang mehrerer paralleler Linien

mit einem automatischen Scanner bewegt wurde. Die Puls-Echo-Daten wurden in Abständen von 40  $\mu\text{m}$  erfasst.

Im Anschluss an die Messungen wurden die Proben wieder bei  $-80^\circ\text{C}$  tiefgekühlt.

Neben offensichtlichen Rissen und Auffaserungen zeigten sich im B-Bild unterschiedlicher Proben charakteristische tiefenabhängige Rückstremuster. Um diese Informationen zu berücksichtigen, wurde eine Software entwickelt, welche die Auswertung der Rückstreuintensität in Abhängigkeit von Frequenz und Tiefe relativ zur Knorpeloberfläche erlaubt. Aus den gewonnenen Daten der Ausschnittsmessungen wurden die tiefenabhängige spektrale integrierte Rückstreuamplitude AIB (Apparent Integrated Backscatter) bestimmt. Dafür wurde vom Puls-Echo Signal durch ein zeitliches Fenster (Hamming-Fenster) das Rückstreusignal in einer bestimmten Tiefe herausgeschnitten. Von diesem und von einem Referenzsignal (ebener Reflektor), welches in der gleichen Tiefe gemessen wurde, wurden die Frequenzspektren bestimmt. Die Differenz der beiden Spektren lieferte die frequenzabhängige Rückstreuamplitude (in Dezibel, dB). Durch Verschieben des Fensters konnte die frequenzabhängige Rückstreuung für jede Tiefe ermittelt werden (siehe **Abbildung 3-3**). Aufgrund der akustischen Dämpfung und des begrenzten Signal-Rausch-Verhältnisses war eine Auswertung mit dem verwendeten Wandler jedoch nur für die oberflächennahen Knorpelschichten (ca. 500  $\mu\text{m}$ ) möglich.

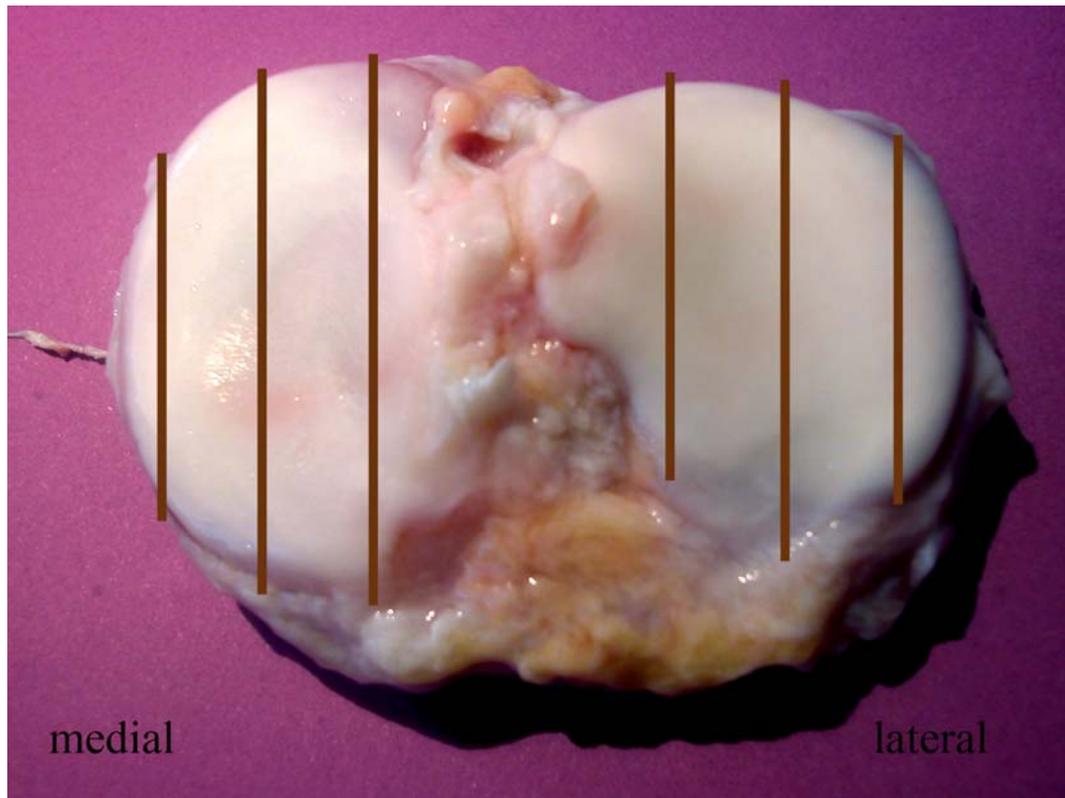


**Abbildung 3-3** Auswertung der Rückstreuparameter; oben links: Puls-Echo Signal (blau) und zeitlich gefensterter Signal aus einer bestimmten Tiefe (rot). Unten links: Referenzsignal eines ebenen Stahlreflektors aus der gleichen Tiefe. Blau und rot kennzeichnet das Signal vor und nach zeitlicher Fensterung. Die dicke blaue Linie zeigt die Abhängigkeit der Reflexionsamplitude von der Fokusebene des Wandlers (Maximum bei 9,5  $\mu\text{s}$ ). Oben rechts: Frequenzspektren der zeitlich gefensterter Signale von Probe (blau) und Referenzreflektor (grün). Unten rechts: Differenz von Proben- und Referenzspektren.

### 3.4 SAM (Scanning Acoustic Microscope; C-Bild Verfahren)

Zur Messung mit dem akustischen Mikroskop (SAM) wurden alle 28 Präparate verwendet. Sie wurden in 2,5 molarer NaCl-Lösung bei Raumtemperatur aufgetaut und für ca. 2 Stunden in dieser Lösung belassen, um einen Ionenausgleich zu erreichen (siehe unten).

Von den Proben wurden jeweils drei Sagittalschnitte vom medialen und lateralen knorpelbedeckten Teil des Plateaus angefertigt – auf jeder Seite ein Schnitt in der Hauptbelastungszone und jeweils ein Schnitt medial und lateral davon. Es ergaben sich also sechs Sagittalschnitte pro Plateau. Bei den mit dem B-Bild Verfahren (siehe 3.3) voruntersuchten Präparaten erfolgte der Schnitt entlang der vorgenommenen Markierung.

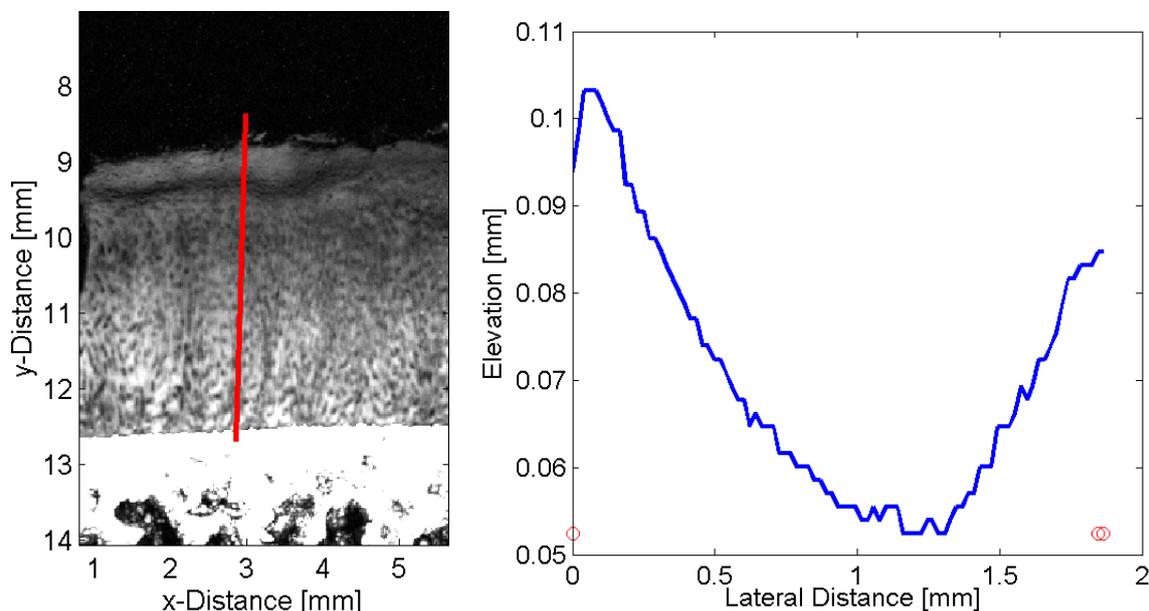


**Abbildung 3-4** Linkes Tibiaplateau in Aufsicht nach Entfernung der Weichgewebe mit Darstellung der Schnittführung.

Jeder Schnitt wurde mit Technovit so auf einen Objektträger aufgebracht, dass eine der beiden Schnittflächen parallel zur Oberfläche des Objektträgers lag. Es lagen also Knorpel und Knochen in der Aufsicht nebeneinander. Anschließend wurden die Proben mit einer Vakuumpumpe entgast. Die Präparate wurden dann kurz in flüssigem Stickstoff gefroren, um im gefrorenen Zustand mit Hilfe einer Ultrafräse eine ebene Grenzfläche zu erzeugen. Danach wurden die Präparate bis zur gleich anschließenden Messung in 2,5 molarer NaCl-Lösung bei Raumtemperatur zwischengelagert.

Eigene Versuche mit Lösungen aufsteigender NaCl-Konzentrationen haben gezeigt, dass die Schwellung des destruierten Knorpels bei ca 2,5 molarer Konzentration der Lösung weitgehend durch deren osmotischen Druck kompensiert werden kann. LAI et al. [29] publizierten Versuche mit intaktem Gelenkknorpel, den sie unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen aussetzten und fanden dabei, dass der Quellungsdruck des Knorpels mit steigender NaCl-Konzentration exponentiell abnimmt. Sie bezogen sich dabei auf gesunden Knorpel und stellten eine 3-Phasen Theorie auf, die den Knorpel in einer festen (die negativ geladenen Glykosaminoglykane) und zwei flüssigen Phasen (Wasser und die zwei Ionenarten Na und Cl) beschreibt. Die feste Phase wird als konstant angenommen; die flüssigen Phasen stehen im Austausch mit dem umgebenden Medium. Dadurch ergibt sich ein

Schwellungsverhalten, das mit dem Donnanpotential zu vergleichen ist. Die positiv geladenen Natriumionen gleichen die negativen Ladungen der Glykosaminoglykane aus. Dadurch nimmt der Knorpel weniger Wasser auf. Da es sich bei den hier durchgeführten Versuchen um Proben handelte, deren Kollagengerüst durch die fortgeschrittene Arthrose schon verändert und an der Schnittkante dazuhin zerstört war, dem Quellungsdruck des Knorpels also nur wenig entgegenzusetzen hatte, stellte sich das Problem, dass der Knorpel ungleichmäßig aufquoll. Bei Verwendung einer hyperosmolaren Lösung ließ sich dieses Problem am besten beherrschen. Die Profilunterschiede zwischen Knorpel und Knochen betragen dann lediglich ca 100  $\mu\text{m}$  (siehe **Abbildung 3-5**).



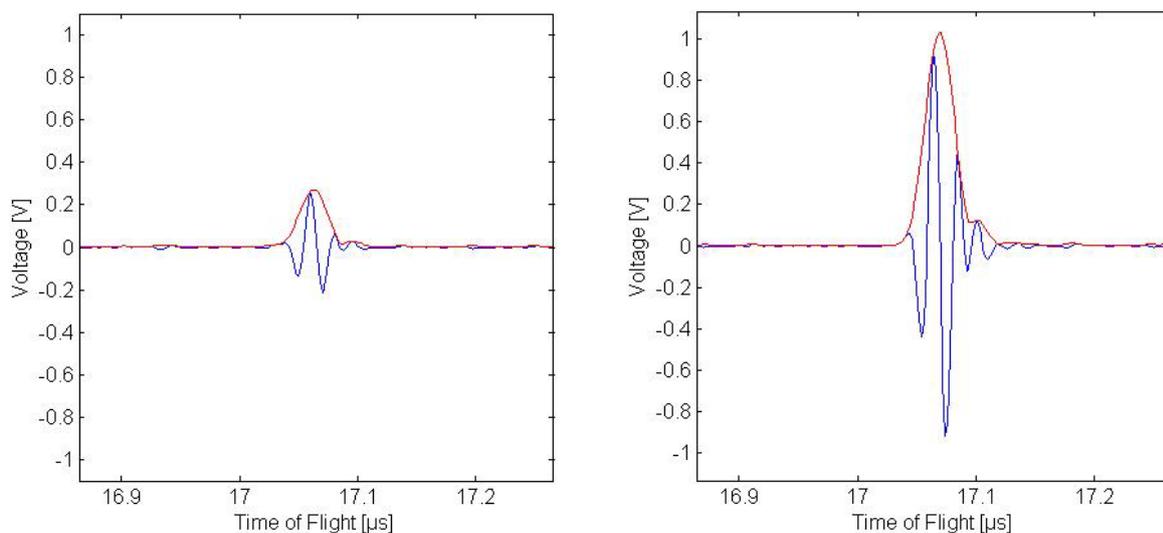
**Abbildung 3-5** Oberflächentopographie des Knorpels; Höhendifferenzen entlang der roten Linie von der Knorpel - Knochengrenze in Richtung der Knorpeloberfläche (aus [30]).

Zur Datenerhebung wurde ein am Labor für Quantitative B-Bild-Sonographie und Akustische Mikroskopie der Medizinischen Fakultät entwickeltes akustisches Mikroskop (SAM200Ex) mit einem fokussierenden 50 MHz Schallwandler (V605, Valpey Fisher, Hopkinton, USA) verwendet. Der Wandler hat einen Fokusabstand von 5 mm und eine Auflösung von 25  $\mu\text{m}$ . Die Funktionsweise des Wandlers entspricht der des Puls-Echo-Verfahrens, das in Abschnitt 1.3 erläutert wurde. Der prinzipielle Messaufbau ist in **Abbildung 3-1** dargestellt.

Beim C-Bild Verfahren wird der Wandler mäanderförmig über die Probe geführt und sendet dabei kurze Schallimpulse aus, die durch eine akustische Linse fokussiert werden. Als Kopplungsmedium wurde entgaste 2,5 molare NaCl-Lösung verwendet. Sowohl die

Oberfläche der Probe als auch in der Probe liegende Strukturen reflektieren oder streuen je nach Größe der Struktur einen Teil der eingestrahlten Schallenergie. Der Teil, welcher zurück auf den Schallwandler trifft, wird wieder in ein elektrisches Signal umgewandelt, das sowohl zu einer bildlichen Darstellung als auch zu einer quantitativen Auswertung verwendet werden kann (siehe Beschreibung des Puls-Echo-Verfahrens in **1.3**). Ein mechanischer Scanner erlaubt eine schnelle und sehr genaue Positionierung. Da die Temperatur bei hohen Frequenzen einen wesentlichen Einfluss auf die Dämpfungseigenschaften des Kopplungsmediums hat, wurden die Messungen in einem temperierbaren Proben tank bei 25°C durchgeführt. Dieser wird von der Bodenplatte aus über einen Regelkreis beheizt, um die Temperatur bei konstanten 25°C zu halten. Die Probe wird auf der Bodenplatte des Tanks fixiert und der Wandler dann in das Kopplungsmedium eingetaucht. So werden Temperatureinflüsse auf Probe, Kopplungsmedium und Wandler minimiert. Von jedem abgerasterten Punkt wird immer das komplette Empfangssignal innerhalb eines vom Benutzer eingestellten Zeitfensters digitalisiert. Das digitalisierte Empfangssignal wird zusammen mit sämtlichen einstellbaren Parametern gespeichert [43].

Da die mittleren Impedanzwerte für Knorpel und Knochen mit 2,1 und 6,3 Mrayl im Mittel sehr unterschiedlich sind, wurden für jede Probe zwei Messungen desselben Messfeldes mit jeweils optimierten Verstärkereinstellungen für die Knorpel- bzw. Knochenmessung durchgeführt. **Abbildung 3-6** zeigt, dass die Intensität des reflektierten Signals von der Knorpelgrenzfläche trotz um 7,5 dB größerer Verstärkung deutlich kleiner ist als die des Signals von der Knochengrenzfläche.



**Abbildung 3-6** Typische Puls-Echo Signale (blau) und Einhüllkurve (rot) von der Knorpelgrenzfläche (links) und der Knochengrenzfläche (rechts).

Der Ort und die Größe der gescannten Felder wurden für jede Probe individuell gewählt. Ausschlaggebend für die Auswahl war hauptsächlich die makroskopische Oberflächenbeschaffenheit. Die Oberfläche sollte möglichst plan sein, um technisch optimierte Ergebnisse zu erhalten, und trotzdem eine deutliche Affektion durch die Arthrose aufweisen.

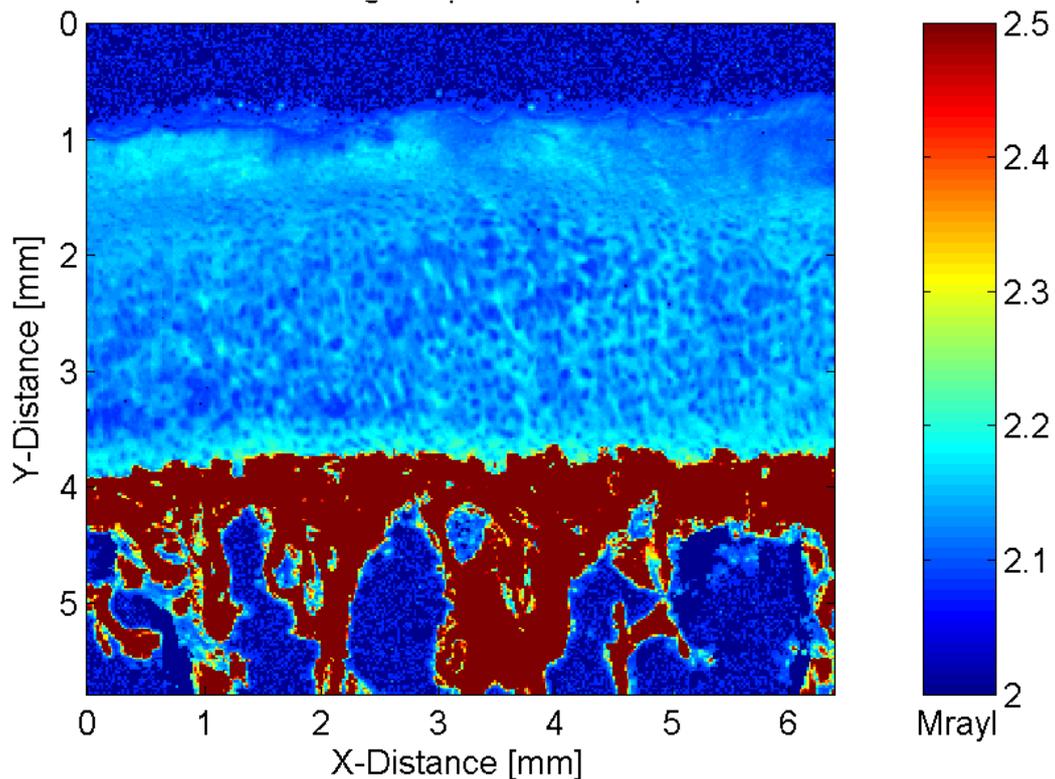
Die Größe der Scanfelder lag in x-Richtung in der Größenordnung um 4000  $\mu\text{m}$  und in y-Richtung um 4500  $\mu\text{m}$ , war jedoch für die jeweilige Messung des Knorpels und des Knochens identisch. In z-Richtung (vertikal) wurde die Position des Wandlers nicht verändert. Der Abstand zwischen zwei Messpunkten betrug in beiden Scanrichtungen 20  $\mu\text{m}$ .

Nach Beendigung der Messungen wurden die Proben wiederum sofort bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgekühlt.

Die Schallgeschwindigkeit in 2,5 molarer NaCl-Lösung bei  $25^{\circ}\text{C}$  beträgt nach WILSON et al. [52] 1540 m/s. Da für Knorpel- und Knochenmessungen jeweils optimierte Verstärkereinstellungen des Mikroskops verwendet wurden, erfolgte die Bestimmung der notwendigen Defokussierungskorrektur- und Impedanzkalibrierungsfunktionen für die jeweiligen Hardwareeinstellungen getrennt nach der von RAUM et al. [45] beschriebenen Methode.

#### 3.4.1 Knorpelimpedanz

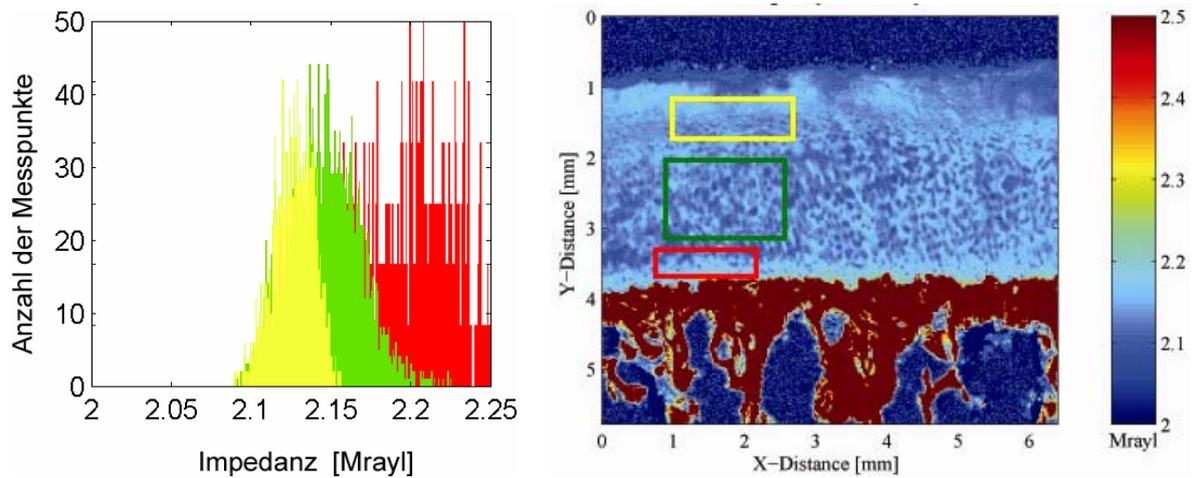
Zunächst wurde die mittlere Impedanz über den gesamten erfassten Knorpel ermittelt. **Abbildung 3-7** zeigt ein Beispiel der Impedanzmessung des Knorpels. Zur Darstellung der heterogenen Verteilung wurde eine impedanzbasierte Farbkodierung gewählt.



**Abbildung 3-7** Darstellung der Impedanzen im Knorpel mit darunterliegendem subchondralem Knochen.

Aufgrund der deutlichen Impedanzunterschiede innerhalb des Knorpels (siehe **Abbildung 3-7** und **Abbildung 3-8**) konnten die drei auch lichtmikroskopisch und biochemisch zu differenzierenden Schichten gut unterschieden werden. Daher wurden die Impedanzwerte für diese Regionen getrennt betrachtet sowie deren Dicken bestimmt.

Es wurde eine Auswertungsroutine entwickelt, welche die mittleren Impedanzen als Funktion des Abstandes von der Knorpel - Knochengrenze bestimmt. Nach einer manuellen Vorauswahl der einzelnen Schichten (siehe **Abbildung 3-8** rechte Seite) wurden im Anschluss die Schichtdicken sowie die mittleren Impedanzen der einzelnen Schichten auf der Basis statistisch signifikanter Impedanzunterschiede ermittelt. Zusätzlich wurden morphologische Parameter des Knorpel - Knochenübergangs (siehe unten unter Knochen) abgeleitet. Die statistische Auswertung wird in Abschnitt **4.2** erläutert.

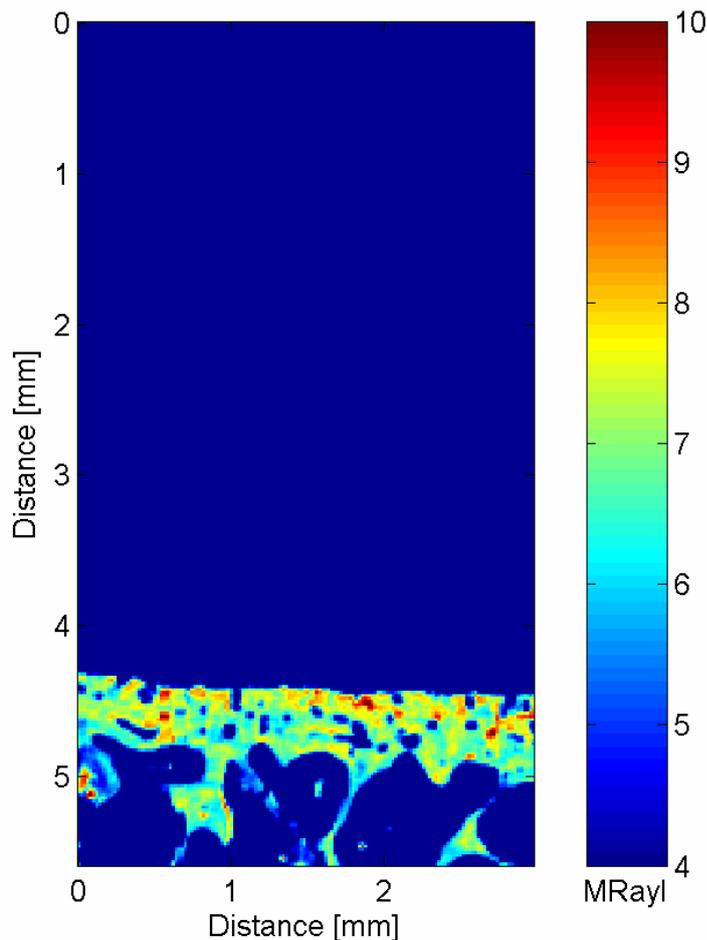


**Abbildung 3-8** Impedanzen der ROIs nach Anzahl der Messpunkte und Darstellung der unterschiedlichen Impedanzwerte der tiefen, mittleren und oberflächlichen Schicht der Probe aus **Abbildung 3-7**.

#### 3.4.2 Knochenimpedanz

Auch für den gesamten erfassten Knochen wurde die Impedanz ermittelt, was ebenfalls in einer impedanzbasierten Farbskala darzustellen war (siehe **Abbildung 3-9**).

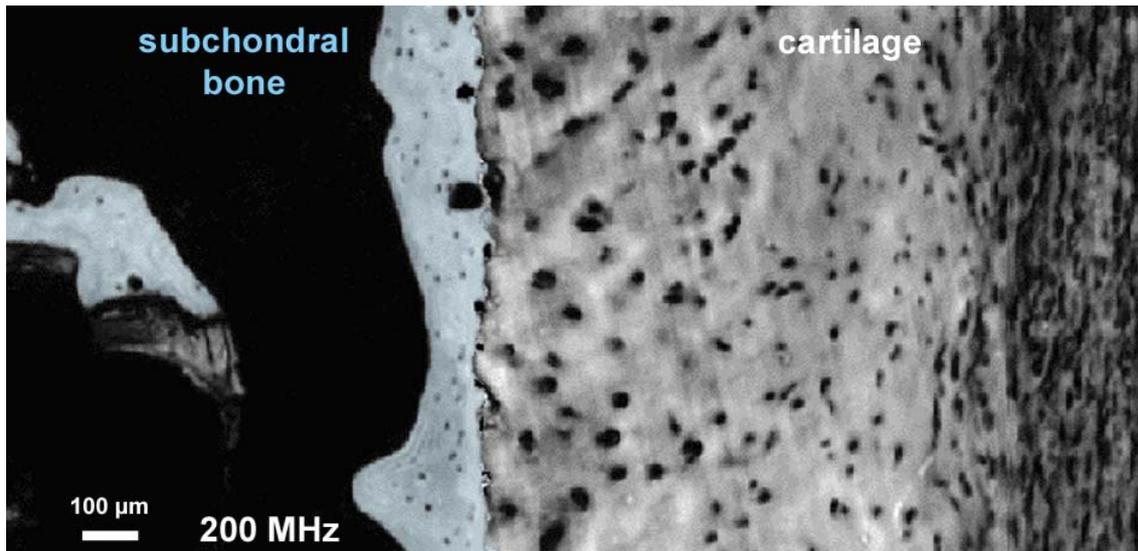
Bei einigen Proben (siehe **Abbildung 3-9**) konnte eine deutliche Impedanzerhöhung direkt subchondral nachgewiesen werden. Die subchondrale Sklerosierung ist ein Parameter in der Röntgenklassifizierung der Arthrose nach Kellgren (siehe **1.2.3**). Aus diesem Grund wurde die Auswertung der Impedanzen wiederum als Funktion zum Abstand von der Knorpel - Knochengrenze bis zu einer Tiefe von 150  $\mu\text{m}$  durchgeführt, um das Ausmaß und die Lokalisation der subchondralen Sklerosierung zu quantifizieren. Eine subchondrale Sklerosierung wurde bei den Proben definiert, bei denen das Maximum der Impedanz innerhalb der ersten 150  $\mu\text{m}$  signifikant höher als die mittlere Impedanz in den tiefergelegenen Knochenzonen war.



**Abbildung 3-9** Darstellung der Impedanzen des subchondralen Knochens mit deutlich sichtbarer subchondraler Sklerosierung (Impedanzerhöhung).

Außerdem wurde die Änderung der Rauigkeit der Knorpel - Knochengrenzfläche (Makro- und Mikrorauigkeit) ermittelt (vergleiche **Abbildung 4-6**). Zur Ermittlung der Makrorauigkeit wurde durch Polynomregression eine Gerade entlang der Knorpel - Knochengrenze gezogen. Die Makrorauigkeit stellt die mittlere absolute Abweichung der Grenze von der Position der Geraden dar (in mm). Zur Ermittlung der Mikrorauigkeit wurde die Grenzlinie mit Hilfe einer Tiefpassfilterung (örtliche Grenzfrequenz: 100  $\mu\text{m}$ ) geglättet. Die Mikrorauigkeit ist die mittlere absolute Abweichung der Grenze von der geglätteten Kurve (in mm).

Versuche von Messungen der Proben bei 200 MHz scheiterten daran, dass die degenerierten Proben sich nicht zufriedenstellend für Messungen bei diesen hohen Frequenzen präparieren ließen. Die Höhenunterschieden innerhalb des Knorpels (siehe **Abbildung 3-5**) waren zu groß. Prinzipiell sind Messungen des Knorpels mit höheren Frequenzen aber möglich. **Abbildung 3-5** zeigt eine Messung bei 200 MHz. Es handelt sich um ein digital nachbearbeitetes Bild, das sich aus mehreren Messungen zusammensetzt.



**Abbildung 3-10** Akustisches Reflexionsbild einer Knorpel - Knochengrenzschicht eines Tibiaplateaus bei 200 MHz. Die unterschiedliche Struktur und Verteilung der Chondrozyten im Knorpel in oberflächennaher, mittlerer und knochennaher Knorpelschicht ist deutlich zu erkennen. Grauwertvariationen in der Kollagenmatrix kennzeichnen variable elastische Eigenschaften. Zwischen mineralisiertem Knochen und nicht mineralisiertem Knorpel besteht eine klar abgezeichnete Grenzlinie, die durch deutlich verschiedene akustische Impedanzen ( $Z_{\text{mean}}(\text{Knochen}) = 6,3 \text{ Mrayl}$ , blaue Farbskala,  $Z_{\text{mean}}(\text{Knorpel}) = 2,1 \text{ Mrayl}$ , graue Farbskala) gekennzeichnet ist. Bild nachbearbeitet.

### 3.5 Histologie und Immunhistochemie

Die Schnitte wurden aufgetaut, von den Objektträgern gelöst, entkalkt und teilweise in Paraffin eingebettet. Es wurden Dünnschnitte in der Paraffin- bzw. Kryoschnittechnik angefertigt. Diese wurden für jede Probe mit Hämatoxylin-Eosin (HE), Safranin-O (Gegenfärbung mit Lichtgrün) und teilweise mit Tenascin-C Antikörpern angefärbt.

Die HE-Färbung veranschaulicht die Morphologie des Knorpels.

Mit Safranin-O werden die Proteoglykane angefärbt. Anhand der Farbintensität lassen sich der Proteoglykangehalt und die Proteoglykanverteilung im Knorpel bestimmen. Ein Fortschreiten der Arthrose geht mit einer Abnahme des Proteoglykangehaltes einher (vergleiche 1.1.2 und **Abbildung 3-11**).

Tenascin-C ist ein Glykoprotein aus einer Familie von Glykoproteinen der extrazellulären Matrix und aus dieser Gruppe bis jetzt am besten beschrieben [21]. Tenascin-C wurde in embryonalen Geweben (Muskel, Sehnen, Skelett) nachgewiesen und spielt eine biomechanische Rolle bei der Knorpel- und Knochenentstehung, Differenzierung und beim

Knorpelwachstum, wobei der Gehalt im Knorpel mit zunehmender Reifung sinkt [21]. Untersuchungen an adulten Geweben zeigten ein Vorkommen in der Haut, in glatten Muskelzellen, in Nervenzellen sowie während der Wundheilung und Tumorentstehung [21]. Funktionell wird dem Tenascin-C eine Vermittlerfunktion zwischen den Zellen und der extrazellulären Matrix zugesprochen [21]. Tenascin-C ist in gesundem Knorpel nur in geringen Mengen nachzuweisen [41] und in arthrotisch verändertem Knorpelgewebe erhöht [10,41] und kann somit als Indikator für das Ausmaß der Schädigung verwendet werden. Die Färbung erfolgte nach Veje et al. [51] mit markierten Tenascin-C Antikörpern (siehe **Abbildung 3-12**).

Um den Grad der Arthrose zu bestimmen, wurden den histologischen Präparaten entsprechend dem Mankin-Score [32] Punktwerte von null bis vierzehn Punkten zugeteilt (siehe **Tabelle 3-1**).

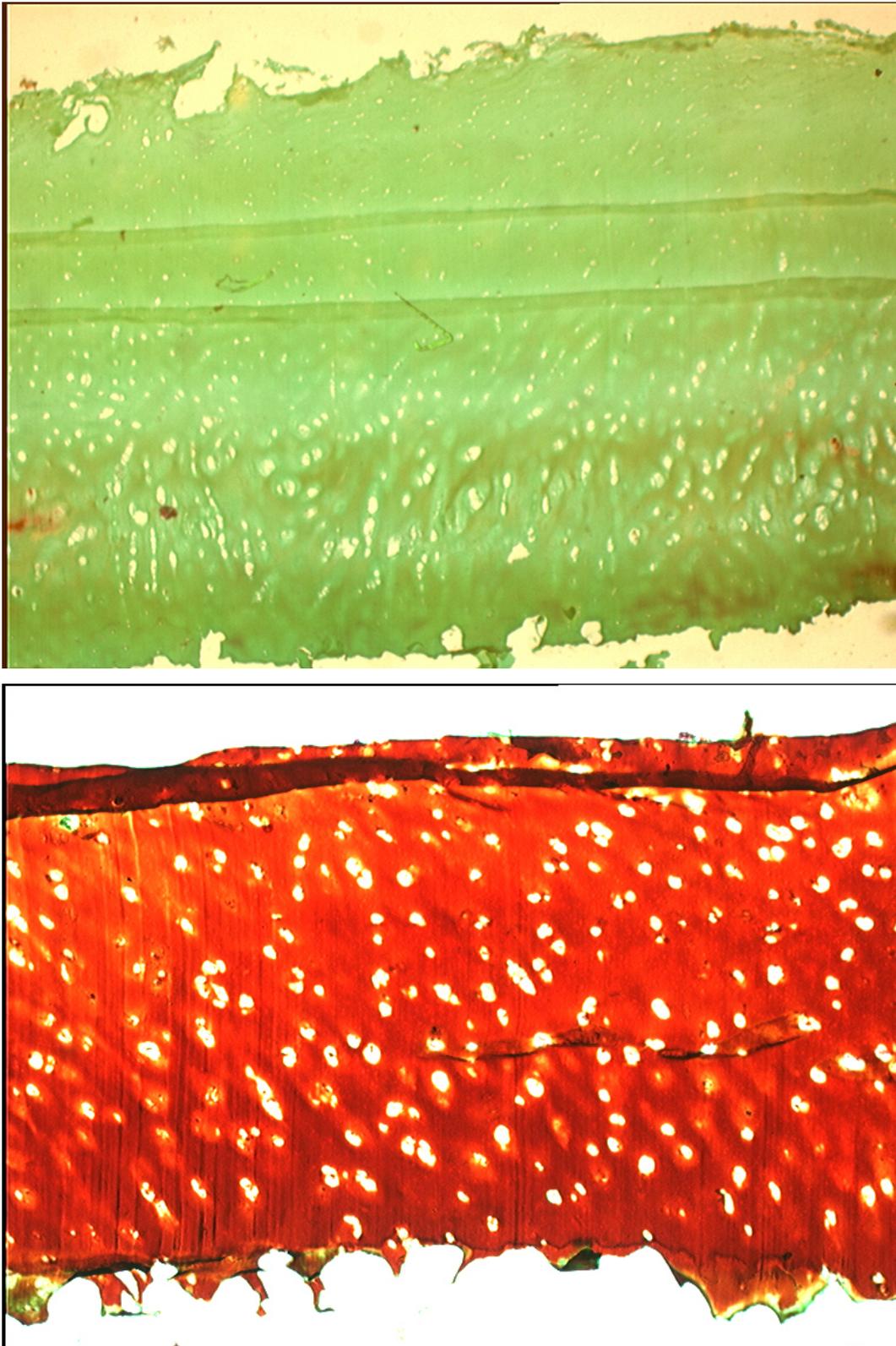
Die Proben, die mit Tenascin-C Antikörpern angefärbt wurden, wurden in Anlehnung an die Untersuchungen von PFANDER et al. [41] und CHEVALIER et al. [10] mit null bis drei Punkten bewertet (siehe **Tabelle 3-2**).

**Tabelle 3-1** Histologische Klassifizierung der Knorpeldegeneration (aus Mankin [32]).

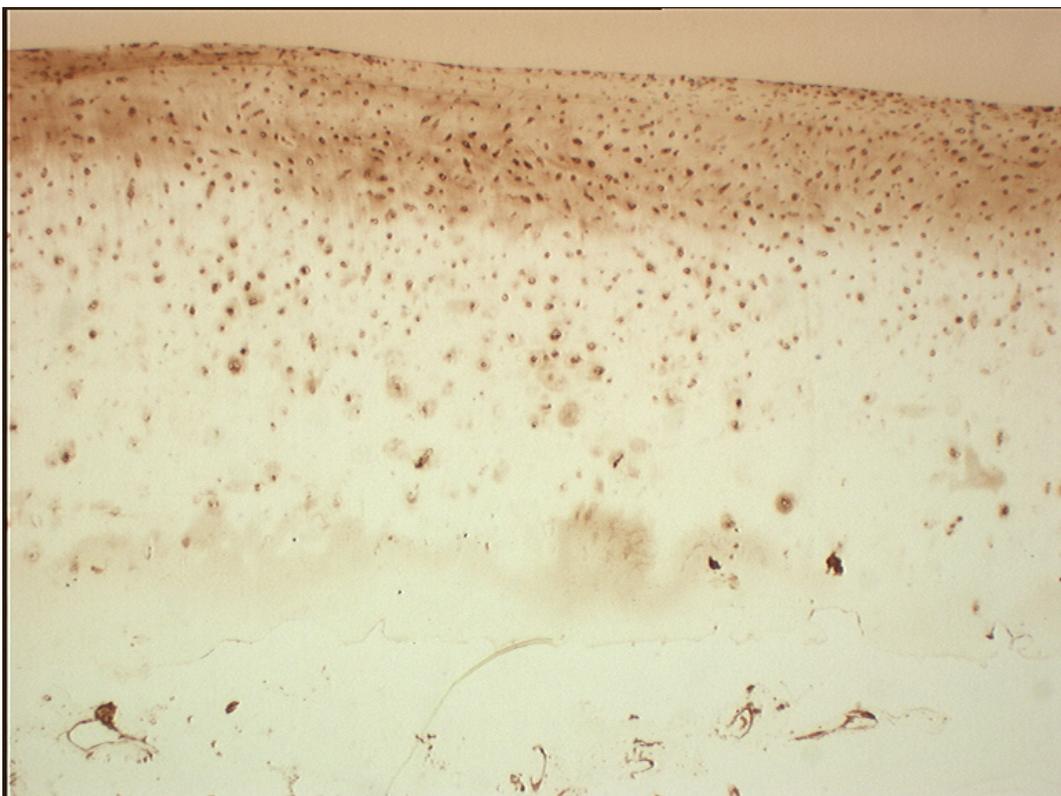
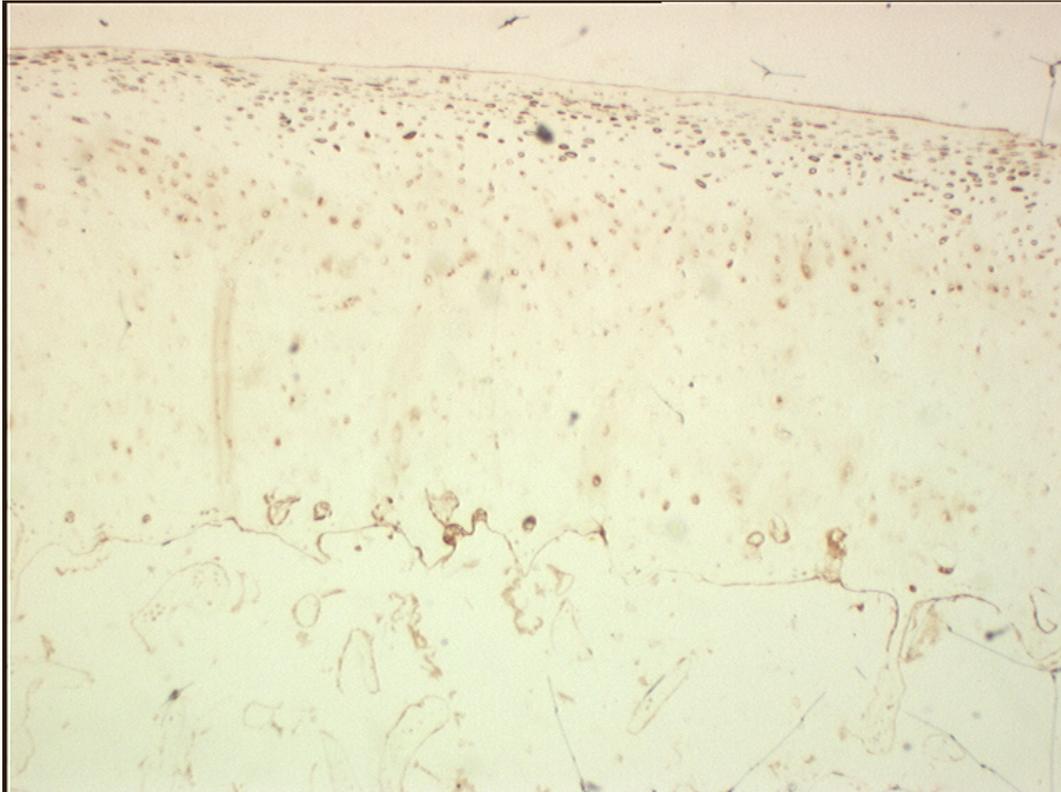
	<b>Grade</b>
<b>Structure</b>	
	0
	1
	2
<b>I</b>	3
	4
	5
	6
<b>Cells</b>	
	0
<b>II</b>	1
	2
	3
<b>Safranin-O staining</b>	
	0
	1
<b>III</b>	2
	3
	4
<b>Tidemark integrity</b>	
<b>IV</b>	0
	1

**Tabelle 3-2** Histologische Klassifizierung der Färbungen mit Tenascin-C Antikörpern

	<b>Grad</b>
Färbung an Knorpeloberfläche	0
Färbung bis mittlere Schicht nur perizellulär	1
Färbung bis mittlere Schicht ganze Knorpelmatrix betreffend	2
Färbung des ganzen Knorpels	3



**Abbildung 3-11** Safranin-O Färbungen (Gegenfärbung mit Lichtgrün); oben: Histologie mit Mankin 3: 4/4 (hoher Arthrosegrad), unten: Histologie mit Mankin 3: 0/4; siehe **Tabelle 3-1**.



**Abbildung 3-12** Färbungen mit Tenascin-C Antikörpern; oben: Färbung nur direkt an der Oberfläche, Tenascin-Score: 0/3; unten: Färbung bis mittlere Schicht perizellulär, Tenascin-Score: 1/3; siehe **Tabelle 3-2**.

### 3.6 Datenauswertung

Alle Werte, die zur statistischen Auswertung herangezogen wurden, wurden mit dem Jarque-Bera-Test auf Normalverteilung bzw. logarithmische Normalverteilung geprüft. Im Text wird nur auf nicht normalverteilte (n.n.) Datensätze hingewiesen. Alle Angaben werden, wenn nicht anders gekennzeichnet, als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Kolinearitäten und Abhängigkeiten zwischen den verschiedenen abgeleiteten Parametern wurden mit Hilfe linearer Regressions- sowie Varianzanalyse (ANOVA) untersucht. Unterschiede in den Verteilungen zwischen mehr als zwei Gruppen wurden mittels ANOVA und anschließendem Post-Hoc Tukey-Test (multiplem Vergleichstest) bestimmt. Das Signifikanzniveau wurde bei  $p \leq 0,05$  festgelegt.

Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit Matlab 6.5 (The Mathworks Inc., Natick, MA USA), die statistische Auswertung der Daten mit Matlab 6.5 und Statistika 7.1 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

---

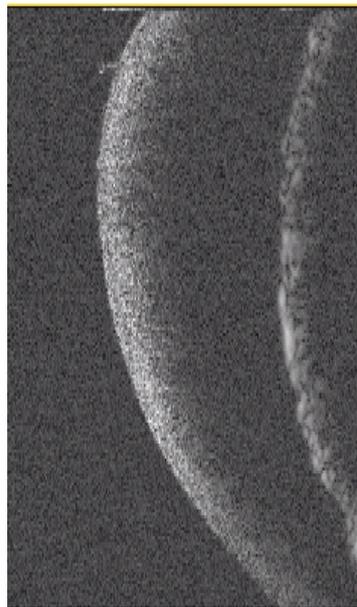
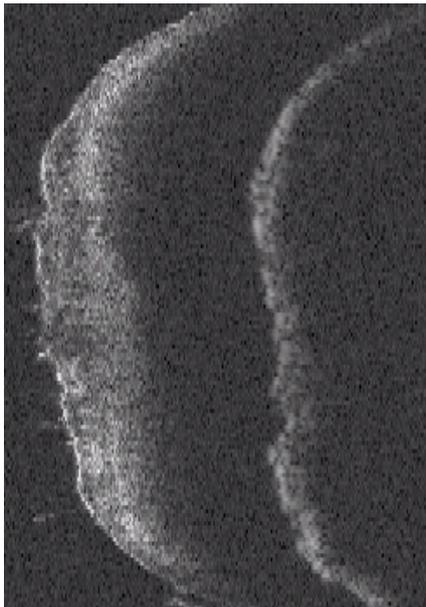
## 4 ERGEBNISSE

Insgesamt wurden Proben von 28 Operationsresektaten (28 Patienten mit manifester Arthrose) sowie eine Kontrollprobe ohne Zeichen einer Arthrose untersucht. Es wurden in Abhängigkeit von der Qualität der Messungen für die jeweiligen Parameter (Rückstreuung, SAM) unterschiedlich viele Proben in die statistische Auswertung aufgenommen (siehe jeweiliger Abschnitt).

### 4.1 Rückstreuung (B-Bild Verfahren)

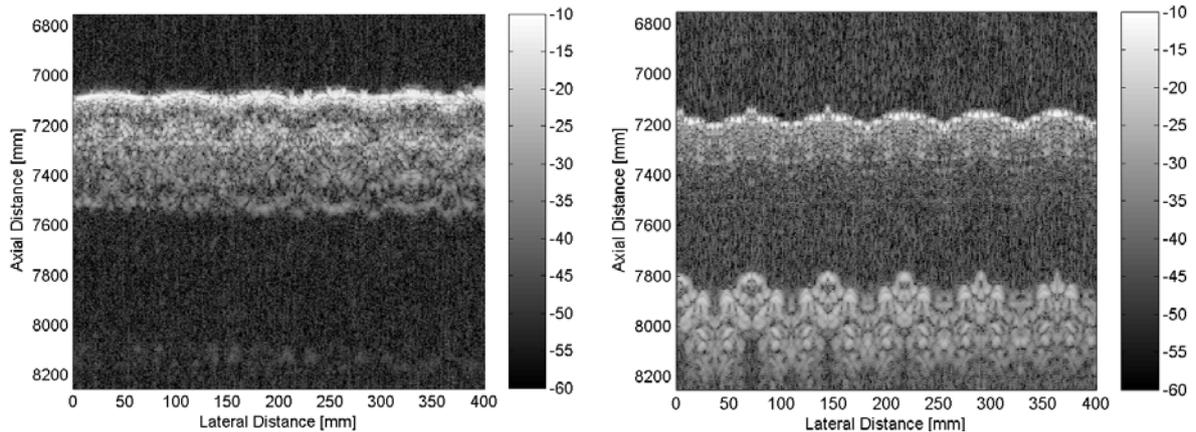
Es wurden 33 Rückstreuemessungen nach dem B-Bild Verfahren an Proben von 15 Patienten durchgeführt.

Schon in den Übersichtsmessungen lassen sich deutliche Zeichen des geschädigten Knorpels sehen (siehe **Abbildung 4-1**). Auch der subchondrale Knochen kann optisch beurteilt werden.



**Abbildung 4-1**  
Übersichtsmessung einer Probe mit starker De-  
struktion (links) und einer  
weniger destruierten (rechts).  
Jeweils von links nach  
rechts: Knorpeloberfläche,  
Rückstreusignal aus der  
oberflächennahen Knorpelre-  
gion, Reflexion am Knorpel-  
Knochenübergang.

Wie in **3.3** ausgeführt, erfolgte in den Ausschnittsmessungen eine quantitative Auswertung der Ultraschallrückstreuung für die oberflächennahen Knorpelschichten bis 500  $\mu\text{m}$ . In **Abbildung 4-2** sind die akustischen Schnittbilder einer arthrotisch veränderten und einer gesunden Probe zu sehen. Die Daten der einzelnen Scanlinien wurden dazu „aufgefaltet“.

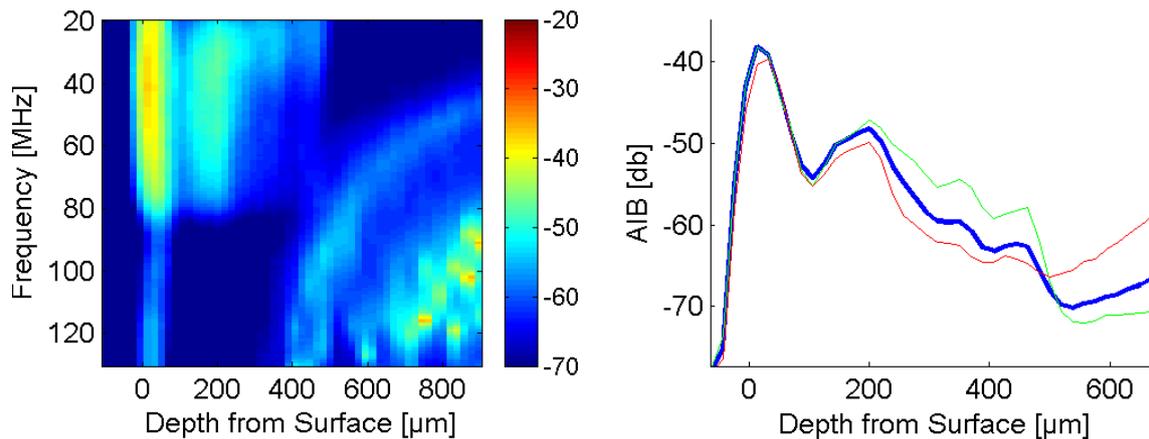


**Abbildung 4-2** Akustisches Schnittbild einer arthrotisch veränderten Probe (links) und der Kontrollprobe (rechts). Links: deutliche Auffaserung der Knorpeloberfläche und vermehrte Streuung innerhalb der Knorpelmatrix direkt unterhalb der Oberfläche; rechts: glatte Knorpeloberfläche und homogenere Streuung.

In den Rückstremessungen zeigten die Proben unterschiedliche tiefenabhängige Rückstremuster. Um diese Informationen zu berücksichtigen, wurde die Rückstreuintensität in Abhängigkeit von Frequenz und Tiefe relativ zur Knorpeloberfläche untersucht (technisches Vorgehen siehe 3.3).

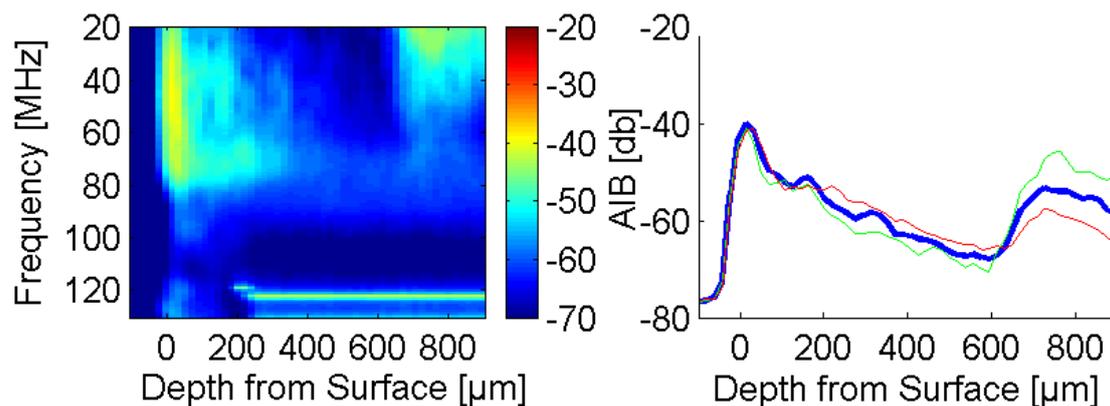
**Abbildung 4-3** und **Abbildung 4-4** zeigen den Unterschied der tiefenabhängigen Rückstreuung der in **Abbildung 4-2** dargestellten Proben. Nach der Oberflächenreflexion ist in **Abbildung 4-3** (entspricht der linken Probe in **Abbildung 4-2**) ein deutlicher Peak des Rückstreusignals bei 200  $\mu\text{m}$  sowie ein abrupter Abfall der Rückstreuung in einer Tiefe von ca 500  $\mu\text{m}$  zu erkennen. Sowohl der Peak als auch der Abfall des Signals sind in **Abbildung 4-2** (links) nachzuvollziehen.

In den Proben, in denen Peaks auftraten, lagen diese zwischen 70 und 280  $\mu\text{m}$  unter der Knorpeloberfläche.



**Abbildung 4-3** Tiefenabhängige Analyse der Rückstreuemuster der arthrotisch veränderten Probe aus **Abbildung 4-2** links; linke Seite: Darstellung der Rückstreumplitude für jede Frequenz (bei den Signalen rechts unten ab 400 µm handelt es sich um Artefakte); rechte Seite: AIB für 30 MHz (grün) und 60 MHz (rot).

In **Abbildung 4-4** (entspricht der rechten Probe in **Abbildung 4-2**) ist ein vergleichsweise kontinuierlicher Abfall der Rückstreuintensität mit nur kleinen Rückstreusignalen unter der Knorpeloberfläche zu sehen. Der erneute Anstieg bei 600 µm wird durch die Knorpel - Knochengrenze verursacht. Auch dies ist in **Abbildung 4-2** (rechts) zu sehen.



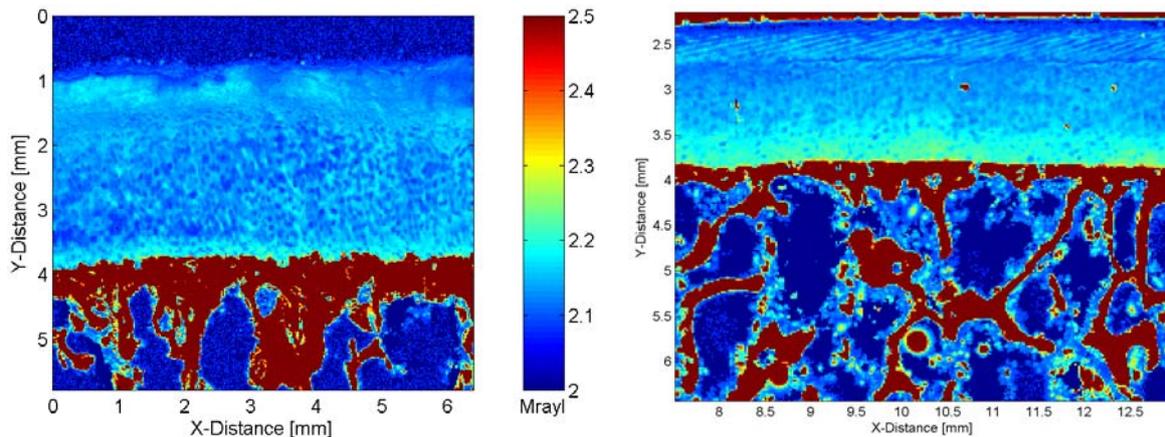
**Abbildung 4-4** Tiefenabhängige Analyse der Rückstreuemuster der Kontrolle aus **Abbildung 4-2** rechts; Darstellung analog **Abbildung 4-3**.

Durch die frequenz- und tiefenabhängige Auswertung der Rückstreuung (siehe **3.3** und **Abbildung 3-3**) bietet sich die Möglichkeit, das Vorhandensein und die Dicke einzelner Schichten sowie deren frequenzabhängige Streu- und Dämpfungseigenschaften zu quantifizieren.

## 4.2 SAM (Scanning Acoustic Microscope; C-Bild Verfahren)

Aus 28 Operationsresektaten ergaben sich 99 Schnitte, die mit dem SAM untersucht werden konnten.

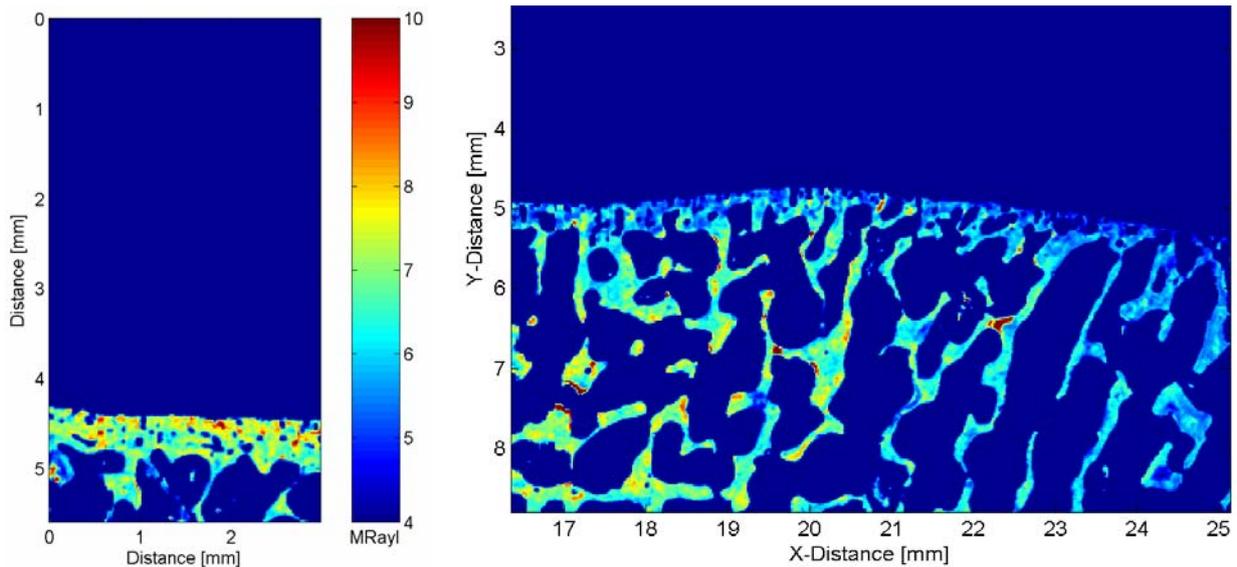
Aufnahmen verschieden stark degenerierter Proben zeigten deutliche Unterschiede innerhalb der Knorpel- (siehe **Abbildung 4-5**) sowie der Knochenstrukturen (siehe **Abbildung 4-6**).



**Abbildung 4-5** Impedanzverteilung innerhalb des Knorpels einer Probe mit höherem Arthrosegrad (links) im Vergleich mit der Kontrolle (rechts); bei den Aussparungen im Knorpel, die in beiden Bildern zu erkennen sind, handelt es sich um Chondrone, in denen in vivo die Knorpelzellen liegen; im rechten Bild sind direkt unterhalb der Knorpeloberfläche Präparationsartefakte zu erkennen.

Für die statistische Auswertung der SAM-Untersuchungen konnten von 99 untersuchten Schnitten in Abhängigkeit von der Qualität der Messergebnisse bis zu 94 verwendet werden. Ausschlusskriterien für eine Probe waren Impedanzwerte, die mehr als die doppelte Standardabweichung vom Mittelwert abwichen. Es ist anzunehmen, dass diese durch Verschmutzungen der Wandlerlinse entstanden. Technisch nicht optimal ausgeführte Messungen (z.B. defokussiert) hatten keinen Einfluss auf Mittelwert und Standardabweichung, da diese Messungen durch die Software automatisch von der Auswertung ausgeschlossen wurden.

Die beschreibenden statistischen Werte werden zunächst für Knochen und Knorpel getrennt betrachtet.

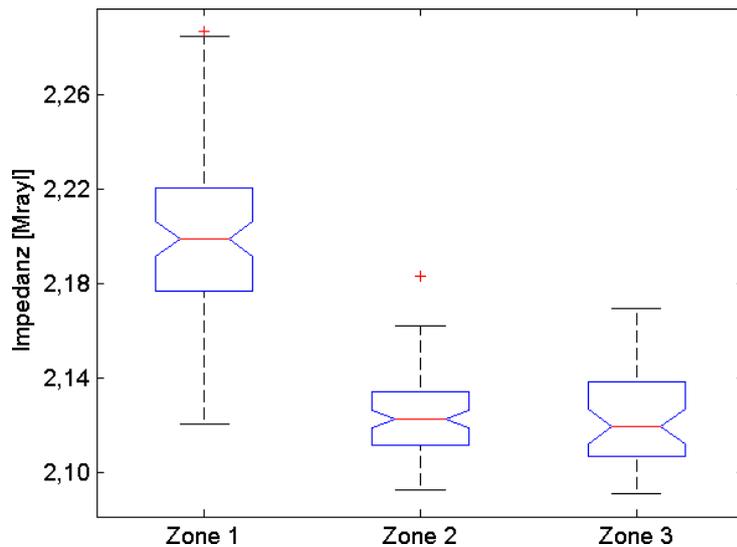


**Abbildung 4-6** Impedanzverteilung des Knochens einer Probe mit höherem Arthrosegrad (links) im Vergleich mit der Kontrolle (rechts); direkt subchondral ist im linken Bild eine deutliche Sklerosierung (Impedanzerhöhung) zu erkennen.

#### 4.2.1 Knorpelimpedanz

Die mittlere Impedanz für den gesamten Knorpel lag bei  $2,14 \pm 0,02$  Mrayl (n.n.) bei 94 ausgewerteten Messungen.

Die Impedanzen der einzelnen Schichten unterschieden sich deutlich (siehe **Abbildung 3-8, 3.4.1**). Bei der Untersuchung der drei verschiedenen Knorpelschichten (siehe **Abbildung 4-7**) ergab sich für die knochen-nahe Schicht ein mittlerer Wert von  $2,20 \pm 0,03$  Mrayl bei 88 ausgewerteten Messungen, für die mittlere Schicht  $2,12 \pm 0,02$  Mrayl bei 89 ausgewerteten Messungen und für die dem Gelenkbinnenraum am nächsten liegende Schicht von  $2,12 \pm 0,02$  Mrayl bei 44 ausgewerteten Messungen. Die knochen-nahe Knorpelzone zeigte eine signifikant höhere Impedanz ( $F = 211$ ,  $p = 0,001$ ) als die beiden oberflächlicheren Schichten, die sich in Mittelwert und Standardabweichung nicht signifikant unterschieden. In einem Teil der Proben zeigte die gelenkbinnenraum-nahe Schicht im Vergleich zur mittleren Schicht wieder einen leichten Anstieg der Impedanz. Dieser Effekt war jedoch nicht signifikant.



**Abbildung 4-7** Abhängigkeit der mittleren Impedanzen von den einzelnen Knorpelschichten. Zone 1: knochennahe Schicht; Zone 2: mittlere Schicht; Zone 3: oberflächliche Schicht; als Box-Whiskers-Plot.

Die Technik zur Ermittlung der Knorpelschichtdicke anhand der Impedanzen wird in Abschnitt **3.4.1** erläutert. Die mittlere Dicke der knochennahen Knorpelschicht betrug  $0,99 \pm 0,91$  mm. Die mittlere Knorpelzone begann bei  $0,34 \pm 0,32$  mm (n.n.) und endete  $2,28 \pm 0,84$  mm relativ zur Knorpel – Knochengrenze.

#### 4.2.2 Knochenimpedanz

Die mittlere Impedanz für die gesamte erfasste Knochenregion betrug  $6,28 \pm 0,54$  Mrayl.

Eine signifikante subchondrale Sklerosierung (vergleiche **Abbildung 4-6** linkes Bild) trat in 65,5 % der untersuchten Fälle auf (55 von 84 Proben). Der Mittelwert der Impedanz der subchondralen Sklerosezone selbst lag bei  $6,71 \pm 0,66$  Mrayl. In Schnitten mit signifikanter subchondraler Sklerosierung erhöhte sich die Gesamtimpedanz des Knochens um 8,8 % im Vergleich zu den Proben ohne signifikante Sklerosierung. Die zur Auswertung entwickelte Technik wird unter **3.4.2** erläutert.

#### 4.3 Histologie und Immunhistochemie

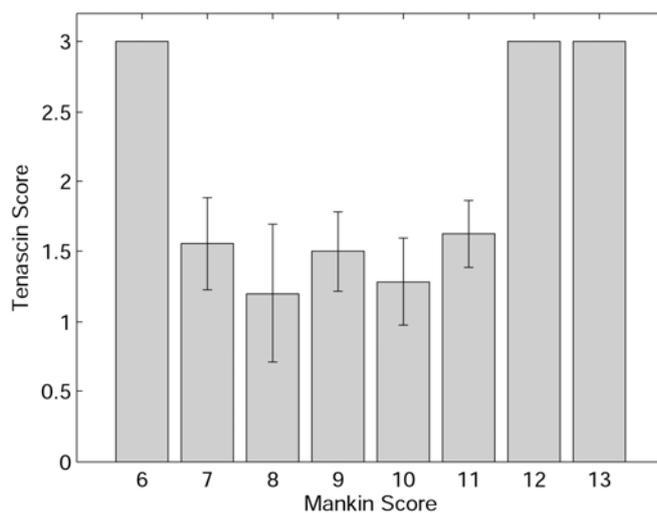
79 der 99 Schnitte konnten für eine histologische Klassifizierung nach dem Mankin-Score herangezogen werden. Die Werte für die Kategorien I bis IV nach Mankin (siehe **Tabelle 3-1** und **Tabelle 4-1**) waren nicht normalverteilt, die Werte für den Mankin-Score (gesamt) waren logarithmisch normalverteilt.

**Tabelle 4-1** Mittelwert und Standardabweichung für die histologische Beurteilung nach dem Mankin-Score

	<b>Kategorie</b>	<b>MW ± Std</b>
<b>I</b>	<b>Structure</b> (0 bis 6 Punkte)	4,31 ± 1,33
<b>II</b>	<b>Cells</b> (0 bis 3 Punkte)	2,02 ± 0,22
<b>III</b>	<b>Safranin-O staining</b> (0 bis 4 Punkte)	2,21 ± 0,93
<b>IV</b>	<b>Tidemark integrity</b> (0 bis 1 Punkte)	0,95 ± 0,21
	<b>Mankin-Score (gesamt)</b> (0 bis 14 Punkte)	9,54 ± 1,79

Für die Tenascin-C Antikörperfärbungen konnten 45 Proben zur statistischen Auswertung herangezogen werden. Es ergab sich ein mittlerer Wert von  $1,53 \pm 1,10$  bei 0 bis 3 möglichen Punkten (siehe **Tabelle 3-2**).

In **Abbildung 4-8** ist zum jeweiligen Wert des Mankin-Score (gesamt) der mittlere Score-Wert der entsprechenden Tenascinfärbung dargestellt. ANOVA ergab keine signifikante Abhängigkeiten zwischen den beiden Parametern ( $F = 0,089$ ;  $p = 0,53$ ).



**Abbildung 4-8** Mittlerer Tenascin-Score (mit Standardfehler) für Proben mit entsprechendem Mankin-Score; bei Mankin-Score 6 und 13 handelt es sich nur um 2 Proben (N für Mankin 6 bis 13: 2, 12, 7, 15, 13, 15, 9, 2).

## 4.4 Untersuchung von Parameterabhängigkeiten

### 4.4.1 Test auf Kolinearität

Ein Test auf Kolinearität der kategorialen Faktoren

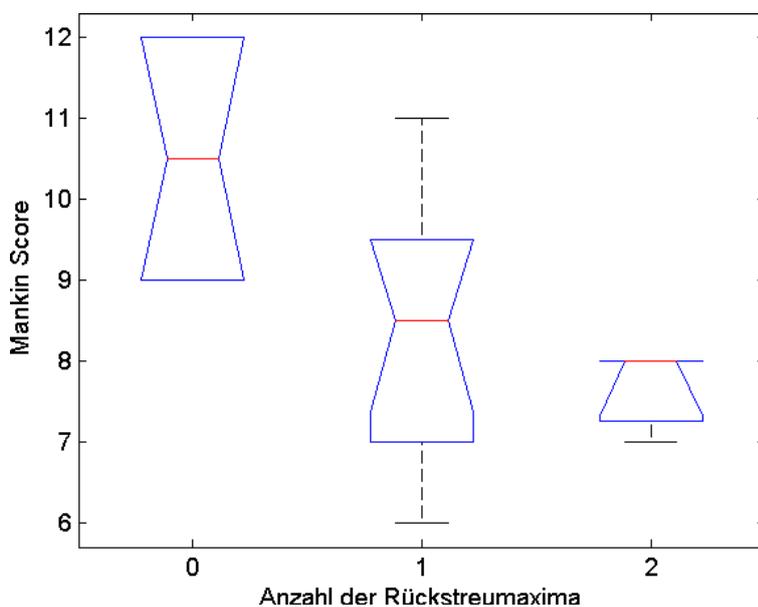
- Mankin-Score
- Tenascin-Score
- subchondrale Sklerosierung und
- Anzahl der Peaks im Rückstreusignal

auf die gemessenen Ultraschallparameter ergab keine signifikanten Abhängigkeiten (siehe **Tabelle 4-2**).

**Tabelle 4-2** F - Statistik und p-Werte des Tests auf Kolinearität.

	Tenascin-Score	subch. Sklerosierung	Peaks
Mankin-Score	F = 0,15; p = 0,93	F = 0; p = 0,95	F = 3,37; p = 0,06
Tenascin-Score	—	F = 2,45; p = 0,12	F = 0,23; p = 0,80
subch. Sklerosierung	—	—	F = 0,17; p = 0,68

Marginal signifikant zeigte sich die Kolinearität zwischen dem Mankin-Score und der Anzahl der Rückstreumaxima mit  $F = 3,37$  und  $p = 0,06$ . Der Mankin-Score fiel tendenziell mit steigender Anzahl der Rückstreumaxima (siehe **Tabelle 4-2** und **Abbildung 4-9**).

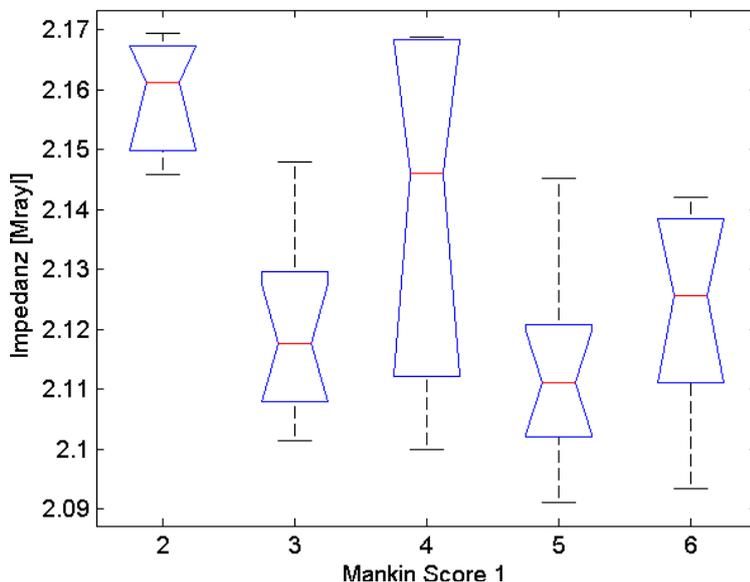


**Abbildung 4-9** Abhängigkeit des Mankin-Scores von der Anzahl der Rückstreumaxima; als Box-Whiskers-Plot.

In einem weiteren Schritt wurde der Einfluss verschiedener Faktoren auf die Impedanzen in Knorpel und Knochen untersucht.

#### 4.4.2 Einfluss der Parameter auf die Knorpelimpedanz

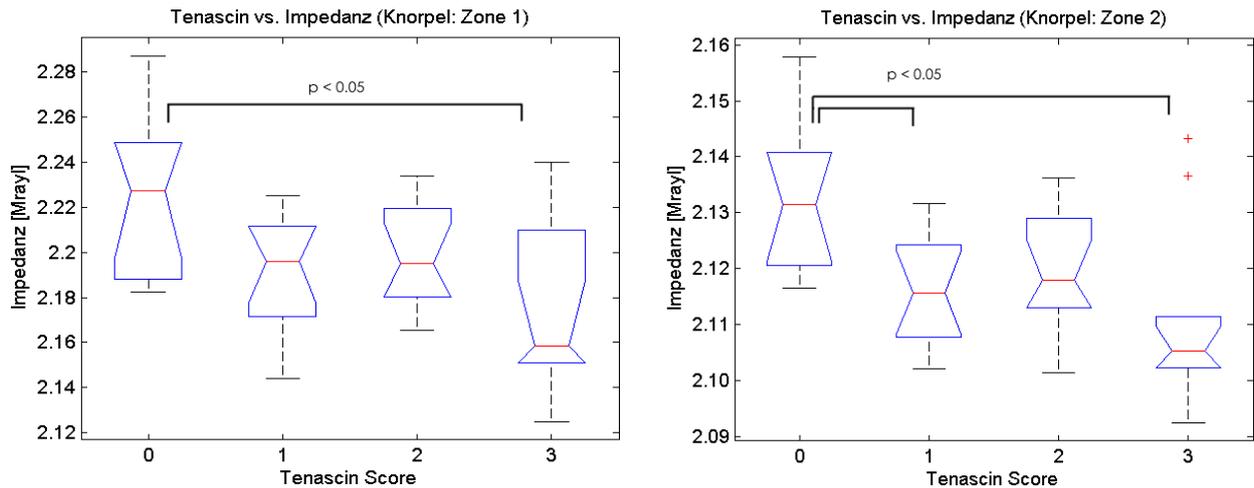
Der Mankin-Score hatte keinen signifikanten Einfluss auf die über alle Zonen gemittelte Impedanz des Knorpels ( $F = 1,03$ ,  $p = 0,43$ ). Bei der Untersuchung der einzelnen Kategorien, die den Gesamtscore nach Mankin ergeben (siehe **Tabelle 3-1**), konnte für die Strukturkomponente (Mankin I) ein signifikanter Einfluss auf die Impedanz der gelenkbinnenraumnahen Knorpelschicht ( $F = 5,06$ ,  $p = 0,0002$ ) festgestellt werden (siehe **Abbildung 4-10**).



**Abbildung 4-10** Abhängigkeit der mittleren Impedanz des Knorpels der gelenkbinnenraumnahen Knorpelzone vom Punktwert der Kategorie I des Mankin-Scores; als Box-Whiskers-Plot.

Der Proteoglykangehalt des Knorpels (Mankin III) zeigte einen signifikanten Einfluss auf die mittlere Impedanz des gesamten Knorpels ( $F = 2,51$ ,  $p = 0,05$ , nicht abgebildet).

Für den Tenascin-Score (siehe **Tabelle 3-2**) zeigte sich ein signifikanter Einfluss auf die Impedanz der knochennahen (Zone 1) und der mittleren (Zone 2) Knorpelschicht mit  $F = 4,06$  bzw.  $5,79$  und  $p = 0,01$  bzw.  $0,002$ . Die Impedanzen wurden kontinuierlich kleiner mit steigendem Score, wobei der Unterschied zwischen dem niedrigsten und dem höchsten Wert in beiden Zonen signifikant war (siehe **Abbildung 4-11**). Auf die mittlere Impedanz des gesamten Knorpels hatte der Tenascin-Score keinen signifikanten Einfluss ( $F = 1,25$ ,  $p = 0,31$ ).

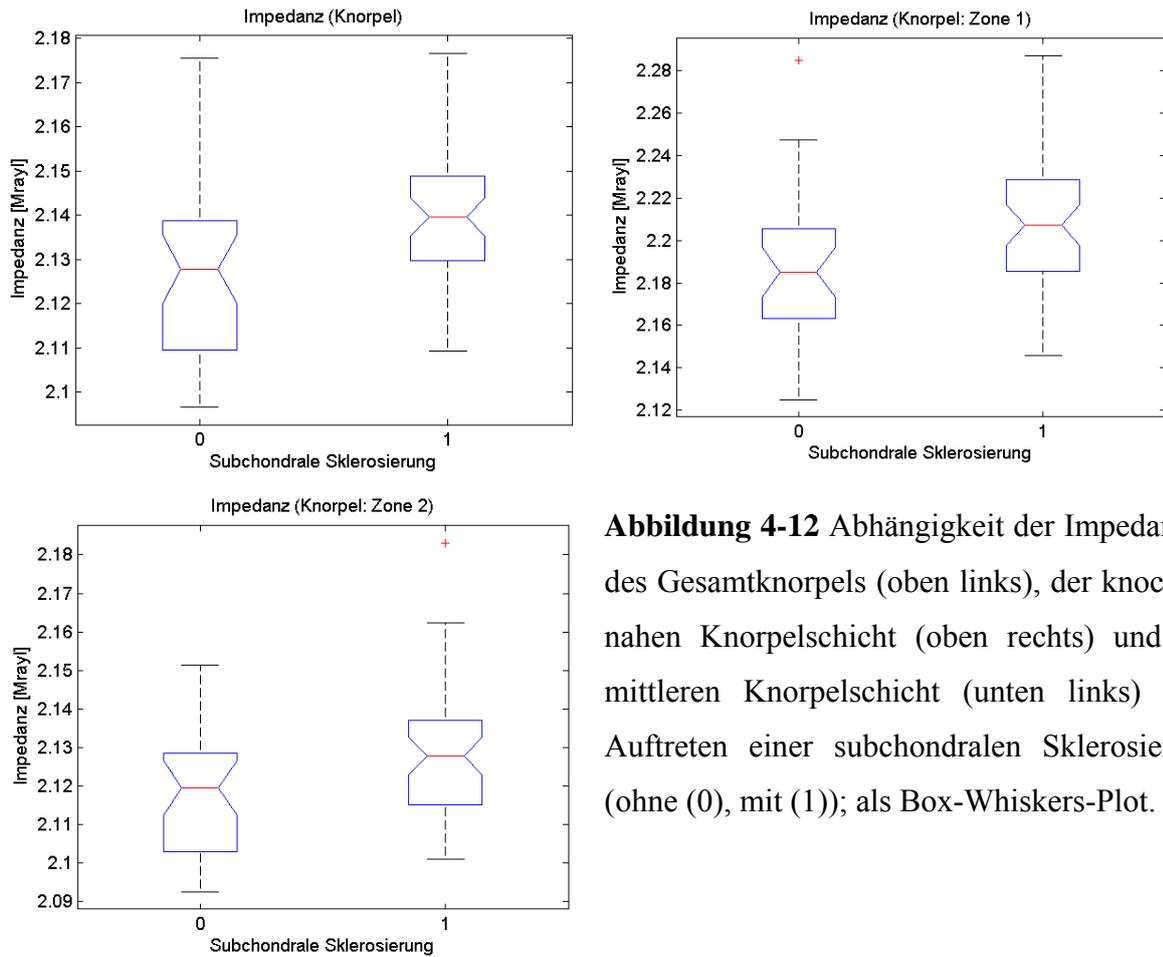


**Abbildung 4-11** Abhängigkeit der Impedanz vom Punktwert des Tenascin-Scores der Zone 1 (knochennahe Schicht; links) und der Zone 2 (mittlere Schicht; rechts).

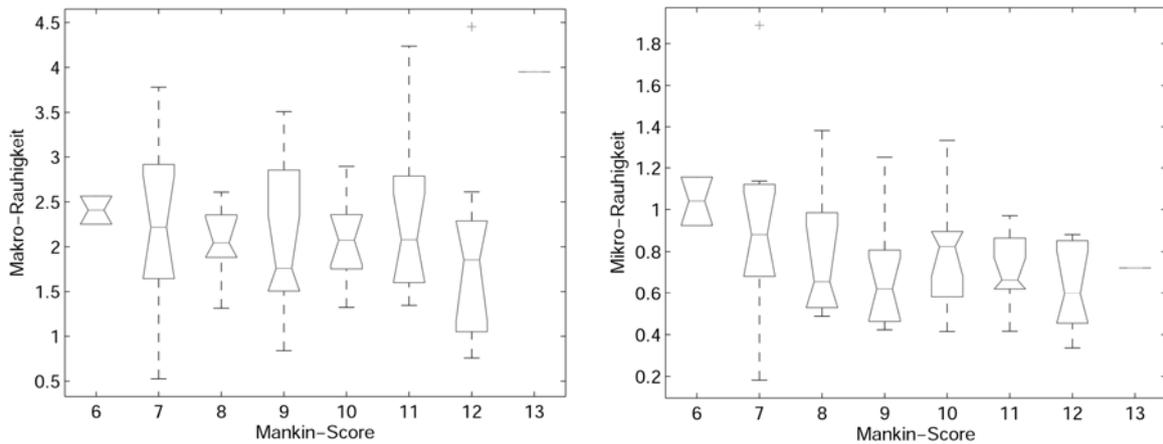
Auf die Impedanzen des Knorpels hatte auch das Auftreten einer subchondralen Sklerosierung einen signifikanten Einfluss (siehe **Abbildung 4-12**). Sowohl die über den gesamten Messbereich gemittelte Impedanz ( $F = 10,52$ ,  $p = 0,01$ ), als auch die Impedanzen der knochennahen Schicht (Zone 1:  $F = 9,15$ ,  $p = 0,01$ ) und der mittleren Schicht (Zone 2:  $F = 7,26$ ,  $p = 0,01$ ) waren im Vergleich zu den nicht sklerosierten Fällen signifikant erhöht.

Die Werte für die Makro- und Mikrorauhigkeit wurden mit steigendem Mankin-Score kleiner (siehe **Abbildung 4-13**). Höhere Tenascin-Scores waren ebenfalls mit einer leichten Reduzierung der Rauheitsparameter verbunden (nicht abgebildet). Diese Einflüsse waren jedoch nicht signifikant.

Die Anzahl der Peaks im Rückstreusignal hatte weder einen signifikanten Einfluss auf die Knochen- noch auf die Knorpelimpedanzen.



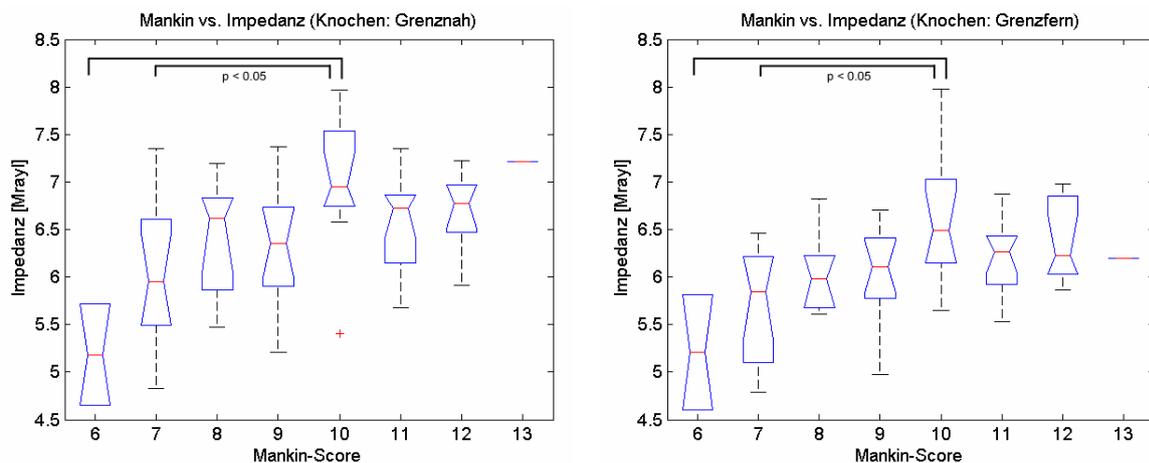
**Abbildung 4-12** Abhängigkeit der Impedanzen des Gesamtknorpels (oben links), der knochen-nahen Knorpelschicht (oben rechts) und der mittleren Knorpelschicht (unten links) vom Auftreten einer subchondralen Sklerosierung (ohne (0), mit (1)); als Box-Whiskers-Plot.



**Abbildung 4-13** Abhängigkeit der Rauhhigkeit des Knorpel - Knochenübergangs vom Wert des Mankin-Score (gesamt); als Box-Whiskers-Plot.

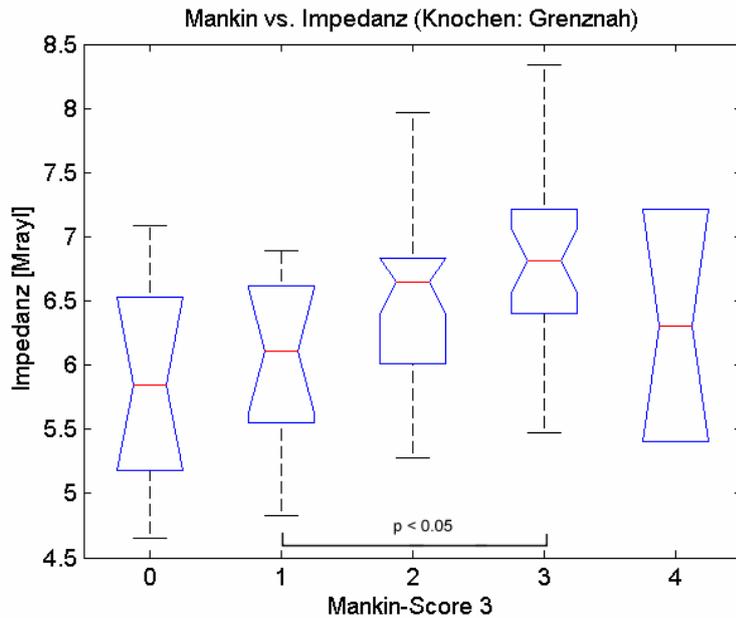
#### 4.4.3 Einfluss der Parameter auf die Knochenimpedanz

Der Punktwert des Mankin-Score (gesamt) zeigte einen signifikanten Einfluss auf die Impedanz des grenzflächennahen subchondralen Knochens ( $F = 3,80$ ;  $p = 0,002$ ) und die mittlere Impedanz in den tieferliegenden Knochenbereichen ( $F = 3,82$ ;  $p = 0,002$ ). **Abbildung 4-14** zeigt einen Anstieg sowohl der grenzflächennahen als auch der tiefergelegenen Knochenbereiche mit steigendem Mankin-Score. Das Maximum wurde bei einem Score von 10 erreicht und fällt für höhere Scores wieder ab. Die Unterschiede waren jedoch nur zwischen den Scores 6 bzw. 7 und 10 signifikant.



**Abbildung 4-14** Abhängigkeit der Knochenimpedanz vom Wert des Mankin-Score (gesamt); als Box-Whiskers-Plot. Impedanzen im subchondralen Knochen in der Nähe der Knorpel - Knochengrenze (links) und in tieferliegenden Bereichen (rechts). In beiden Bereichen steigt die Impedanz bis zum Wert von 10 Punkten im Mankin-Score (gesamt). Die Impedanzen bei 6 und 7 Punkten sind signifikant kleiner als die Impedanzen bei einem Wert von 10 Punkten.

Nach Unterteilung in die einzelnen Kategorien des Mankin-Scores ergaben sich lediglich für Kategorie III (Proteoglykangehalt, siehe **Tabelle 3-1**) signifikante Einflüsse auf die Knochenimpedanz. In **Abbildung 4-15** ist die Beziehung zwischen Mankin III und der grenzflächennahen Knochenimpedanz dargestellt ( $F = 3,70$ ;  $p = 0,009$ ).



**Abbildung 4-15** Abhängigkeit der Impedanz im subchondralen Knochen in der Nähe der Knorpel - Knochengrenze vom Wert der Kategorie III des Mankin-Scores; als Box-Whiskers-Plot. Die Impedanz bei einem Punktwert von 3 ist signifikant größer als bei einem Wert von 1.

Weder der Tenascin-Score noch die Mikro- bzw. Makrorauhigkeit hatten einen Einfluss auf die Impedanzwerte im Knochen.

Die Grenzfläche erschien mit steigendem Arthrosegrad (steigendem Mankin-Score) immer weniger rau (siehe **Abbildung 4-13**).

---

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Methodik

Da die untersuchten Proben bis auf die Kontrollprobe aus der Knieendoprothetik gewonnen worden waren, wiesen alle einen hohen Arthrosegrad auf. Die Arthrose ist allerdings kein generalisiertes Geschehen, das in allen Kompartimenten des Gelenks zeitgleich abläuft. So liegen in einem Gelenk verschiedene Stadien der Destruktion vor. Stärker gewichtsbelastete und eher zentrale Anteile verlieren schneller an Substanz als randständige Bezirke, die geringeren mechanischen Belastungen ausgesetzt sind. Dies ermöglichte es uns, verschiedene Stadien parallel in einem Gelenk zu untersuchen. Mit dieser Zielsetzung wurden die Proben präpariert (siehe **3.3**, **3.4** und **Abbildung 3-4**) und untersucht.

Während der Bearbeitung wurde der Knorpelanteil der Proben mit einer 2,5 molaren NaCl-Lösung vor dem Austrocknen geschützt. Diese Lösung wurde auch für die Messungen als Kopplungsmedium verwendet. Natrium- und Chloridionen gehören zu den wichtigsten Salzen sowohl im intrazellulären als auch im extrazellulären Wasserhaushalt des Körpers. Die verwendete Konzentration übersteigt die physiologische Konzentration der Salze um ein Vielfaches. Diese hohe Konzentration war jedoch nötig, um dem Quellungsdruck des Knorpels entgegenzuwirken, da an den Schnittflächen das Kollagengerüst zerstört wurde und dadurch dessen stützende Wirkung verloren ging (siehe **3.4**). Es ist anzunehmen, dass die hohe Salzkonzentration Einfluss auf die Integrität der Zellen nimmt, was jedoch für die hier vorgestellten Versuche nicht relevant war, da die Zellen selbst nicht Untersuchungsgegenstand waren. Durch die Verwendung der Salzlösung ergab sich der Vorteil, die Knorpelmatrix mit den vorgestellten Ultraschalltechniken nativ untersuchen zu können. Ein langwieriger Einbettungsvorgang und die Veränderung des Untersuchungsmaterials durch Einbettungsmedien (z.B. PMMA) entfielen. Auch konnten Knorpel und Knochen wie in vivo im Verbund belassen werden und mussten aufgrund ihrer sehr unterschiedlichen Beschaffenheit für die Präparation nicht getrennt werden. Die Proben wurden also so nah wie möglich an den in vivo Verhältnissen untersucht.

Mit arthroskopischen in vivo Methoden an humanen Probanden konnten LYYRA et al. [31] durch ein Indentationsverfahren die Steifigkeit des Knorpels in verschiedenen Kompartimenten des humanen Kniegelenks bestimmen. In Kombination des Indentationsinstrumentes mit einem nichtfokussierenden Ultraschallwandler zeigten LAASANEN et al. [26-28] am Tiermodell in vitro die Möglichkeit einer quantitativen Bestimmung der Knorpeldicke und konnten Informationen von der Knorpeloberfläche und

aus oberflächennahen Knorpelschichten gewinnen (Oberflächenreflexion, Rückstreuamplitude). Eine orts aufgelöste Auswertung der Rückstreuparameter ist jedoch bei einem nicht fokussierenden Schallwandler nicht möglich.

Nach chemischer Reduktion des Proteoglykangehaltes konnten JOINER et al. [23] einen 20-30 %-igen Anstieg der frequenzabhängigen Dämpfung und einen 2 %-igen Abfall der Schallgeschwindigkeit in humanen und bovinen Proben feststellen. Die Reduktion des Proteoglykangehaltes stellt ein künstliches Arthrosemodell dar, da ein sinkender Proteoglykangehalt als ein bekannter Bestandteil des Pathomechanismus der Arthrose gilt. Diese Verfahren ermöglichen die Ableitung globaler Parameter der Knorpelmatrix, lassen jedoch keine orts aufgelöste Zuordnung zu bestimmten Strukturen zu. Die orts aufgelöste Bestimmung struktureller und elastischer Veränderung arthroseinduzierter Veränderungen stellt jedoch eine wichtige Basis zum besseren Verständnis des Ablaufs und Fortschreitens des Krankheitsgeschehens und zu einer zuverlässigen Interpretation der in vivo ableitbaren Ultraschallparameter dar. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei hochauflösende Ultraschallverfahren für die Anwendung an humanem Knorpelgewebe entwickelt und mit etablierten histologischen und immunhistochemischen Klassifizierungsmodellen verglichen. Die sich daraus ergebenden Möglichkeiten werden im Folgenden aufgezeigt.

### 5.1.1 Rückstremessung (B-Bild Verfahren)

Die technischen Gegebenheiten des Mikroskops, das für diese Messungen verwendet wurde, erlaubten nur die Erhebung von Daten über sehr kleine Flächen (0,4 x 2 mm). Die Messung größerer Flächen wäre mit einer erheblichen Verlängerung der Messzeit und damit mit einer noch geringeren Probenzahl verbunden gewesen. Dazu kam eine sehr geringe örtliche Auflösung (30  $\mu\text{m}$  in axialer und 60  $\mu\text{m}$  in lateraler Richtung) und eine geringe Anzahl von Messpunkten. Messzeit (ca. 2 h  $\text{mm}^{-2}$ ) und Anzahl der Messungen (700  $\text{mm}^{-2}$ ) waren dadurch nicht optimal.

Diese Messungen erlaubten jedoch eine Datenerhebung ohne zeitaufwändige Präparationsschritte und eventuelle Beeinflussung der Strukturen innerhalb der Proben durch die Präparation. Der Versuchsaufbau mit Schallachse orthogonal zur Knorpeloberfläche entspricht dem möglichen in vivo Aufbau, der prinzipiell während der Arthroskopie anwendbar ist.

Die Auswertung der Daten erlaubt eine frequenz- und tiefenabhängige Charakterisierung des Rückstreusignals und damit Information über das Vorhandensein einzelner Schichten sowie deren frequenzabhängige Streu- und Dämpfungseigenschaften. In

Abschnitt **5.2** sind die Ergebnisse der Auswertung im Vergleich mit der SAM-Technik und der histologischen Auswertung dargestellt.

Statistisch ergab sich im Test auf Kolinearität des Mankin-Scores und der Anzahl der Rückstreumaxima auf die gemessenen Ultraschallparameter einen marginal signifikanten Abfall des Mankin-Scores bei steigender Anzahl der Rückstreumaxima (siehe **4.4.1**, **Tabelle 4-2** und **Abbildung 4-9**). Dies lässt vermuten, dass das Auftreten einer echoreichen Schicht unterhalb der Knorpeloberfläche für ein mittleres Stadium der Arthrose typisch ist, denn mit Fortschreiten der Arthrose (Anstieg des Mankin-Scores) nimmt die Anzahl der Rückstreumaxima ab. In **Abbildung 5-1** zeigt eine schwer geschädigte Probe keinen Peak im Rückstreusignal. In **Abbildung 5-2** zeigt eine weniger degenerierte Probe einen deutlichen Peak im integrierten Rückstreuspektrum und in **Abbildung 4-4** sieht man an der gesunden Vergleichsprobe lediglich mehrere sehr kleine Peaks.

Als vorletzte Stufe der Zellveränderungen in der Kategorie Mankin II - bevor ein Untergang der Zellen mit dann insgesamt verminderter Zellzahl eintritt (siehe **Tabelle 3-1**), wird eine Zusammenlagerung und Proliferation der Zellen in den oberflächennahen Schichten beschrieben ("Cloning"), was als Regenerationsversuch des Knorpels interpretiert wird. Da die Größe der Zellen mit ca 30 µm kleiner war oder an der unteren Grenze der zur Messung verwendeten Wellenlängen (ca. 30 - 90 µm) lag, verursachte möglicherweise die größere Zellzahl in der Phase des Regenerationsversuchs dieses Signalcharakteristikum (zur Entstehung von Streuung siehe **1.3**). In der immunhistochemischen Färbung mit Tenascin-C Antikörpern würde man dann eine deutliche Färbung des Knorpels als Nachweis einer hohen Expressierung von Tenascin-C als Zeichen dieses Regenerationsversuches erwarten (siehe **3.5** und **5.1.3**). In **Abbildung 4-8** ist ein solcher Zusammenhang nicht zu erkennen. Auch im Test auf Kolinearität in **4.4.1** zeigte sich, dass Mankin- und Tenascin-Score nicht die gleiche Aussage treffen. Der Mankin-Score kennzeichnet die Degeneration, der Tenascin-Score die Regenerationsaktivität des Knorpels. Die fehlende Kolinearität deutet möglicherweise darauf hin, dass die beiden Vorgänge nicht zeitgleich auftreten oder aber nicht jeder Knorpel das gleiche Regenerationspotential besitzt, denn hohe Tenascin-Scores treten sowohl bei mittleren wie auch bei sehr hohen Mankin-Scores auf (vergleiche **Abbildung 4-8**). Bei einer Anzahl von 35 Färbungen mit Tenascin-C Antikörpern im Vergleich zu 79 Proben, die nach dem Mankin-Score klassifiziert wurden, könnte ein Grund auch im Missverhältnis der Gruppengröße und der vergleichsweise geringen Anzahl der Tenascinfärbungen liegen.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für das Fehlen der Peaks im Rückstreusignal bei hohen Mankin-Scores und damit stark degenerierten Proben bietet die abnehmende

Knorpeldicke. Im gesunden Knorpel zeichnen sich die Zonenübergänge durch unterschiedliche Zellzahl, -form und -dichte, unterschiedliche Orientierung der Kollagenfasern sowie unterschiedliche Matrixzusammensetzung ab. Dies führt zu mehreren kleinen Peaks im Rückstreusignal (siehe **Abbildung 4-4**). Bei mittlerer Schädigung findet wie schon beschrieben ein „Cloning“ der Zellen statt und es ist anzunehmen, dass sich die Zusammensetzung der Knorpelmatrix als Regenerationsversuch verändert. Es entsteht eine „repair-Zone“ unterhalb der Knorpeloberfläche, die im B-Bild als starker Peak zu sehen ist und die sich in der Tenascinfärbung deutlich darstellt (siehe **Abbildung 5-2**). Schreitet nun die Schädigung voran, nimmt auch die Knorpeldicke ab und der bei mittlerer Schädigung beobachtete Peak im Rückstreusignal verschwindet (siehe **Abbildung 5-1**). Da der geschädigte Knorpel sich von der Oberfläche her abträgt, wird möglicherweise in diesem Stadium die mittlere Zone als Oberfläche detektiert, da die oberflächliche Zone bereits abgetragen ist. Diese Hypothese wird durch die unterschiedliche Orientierung der Kollagenfasern in den einzelnen Schichten unterstützt. Untersuchungen der Ultrastrukturen des Knorpels zeigen, dass die Hauptorientierungsrichtung der Kollagenfasern in den Knorpelschichten unterschiedlich ist. Der Übergang zwischen oberflächlicher und mittlerer Zone liegt demnach bei 200  $\mu\text{m}$  [2]. Dort gehen die Fasern von einem tangentialen Verlauf in einen ungeordneten Verlauf über und streben dem vertikalen Verlauf der tiefen Zone zu. Da die Peaks der ermittelten Rückstreusignale zwischen 70  $\mu\text{m}$  und 280  $\mu\text{m}$  liegen, ist es denkbar, dass es an dieser Übergangszone schon früh im Arthrosegeschehen zu einer Veränderung wie Bruch oder Zerstörung der Kollagenfasern kommt und dies zu den charakteristischen Veränderung der Rückstreusignale beiträgt. Eine Änderung der Schallgeschwindigkeit und der Dämpfungseigenschaften in Abhängigkeit von der Orientierung der Kollagenfasern wurde von AGEMURA et al. [2] bereits beschrieben.

Das Auftreten und die Anzahl der Rückstreumaxima hatte weder einen signifikanten Einfluss auf die Knochen- noch auf die Knorpelimpedanz. Eine Beziehung zwischen den oberflächennahen Rückstreusignalen aus dem Knorpelgewebe und der Impedanz im subchondralen Knochen war jedoch höchstens indirekt zu erwarten. Das Fehlen einer Beziehung zwischen Rückstreuparametern und der Impedanz lässt sich dadurch erklären, dass in dieser Untersuchung nur einige Informationen aus dem Rückstreusignal verwendet wurden. Das Auftreten und die Anzahl von lokalen Streumaxima deutet auf strukturelle Änderungen der Knorpelmatrix hin, während die Impedanzmessung die elastischen Eigenschaften der Matrix erfasst. Prinzipiell wird das Rückstreuspektrum sowohl durch strukturelle als auch elastische Eigenschaften von Streuern sowie der umgebenden Matrix bestimmt. Für die

Ableitung dieser Parameter sind allerdings hochentwickelte Streumodelle notwendig [4], deren Entwicklung den Rahmen dieser Arbeit übersteigt. Die Kombination der beiden Ultraschallverfahren bildet jedoch die Basis, um ein besseres Verständnis für die Herkunft der Rückstreusignale zu erreichen.

### 5.1.2 SAM (Scanning Acoustic Microscope; C-Bild Verfahren)

Die Präparation der ca. 5 mm dicken Sagittalschnitte gestaltete sich sehr zeitaufwändig und aufgrund der fortgeschrittenen Degeneration der Proben oft technisch schwierig. In nachfolgenden Projekten wurde für die Knorpelpräparation zu einer nativen Dünnschnitttechnik übergegangen, die weniger zeitaufwändig ist und zudem weitere technische Möglichkeiten, z.B. die Messung der Schallgeschwindigkeit, eröffnet.

Mit dem SAM lässt sich quantitativ die akustische Impedanz ermitteln, die sehr gut die elastischen Eigenschaften des untersuchten Materials repräsentiert (siehe **1.3**).

Mit dem C-Bild Verfahren war aufgrund der unterschiedlichen Impedanzen innerhalb des Knorpels eine Differenzierung der Schichten und die Bestimmung der Schichtdicke möglich (Vorgehen siehe **3.4.1** und **Abbildung 3-8**). Beim Auftreten einer dritten (gelenkbinnenraumnahen) Knorpelschicht ist meist ein Peak im Rückstreusignal und in der Histologie in der gleichen Tiefe ein Cloning der Zellen zu sehen (siehe **Abbildung 5-2**).

Es ist also zu vermuten, dass der bei degenerierten Proben auftretende Peak im Rückstreusignal durch die Änderung der Zellzahl und ihre Anordnung mitverursacht wird (vergleiche **5.1.1**). Eine weitere Erklärung für das Auftreten dieser Impedanzerhöhung kann eine veränderte Matrixzusammensetzung durch qualitative oder quantitative Veränderung der Matrixsynthese im Rahmen des Regenerationsversuches durch die Knorpelzellen sein.

Die subchondrale Sklerosierung ist eine Veränderung, die als arthrosespezifisch bekannt sind und in gängige röntgenologische Scoringsysteme eingeht [13,48-50]. Mit dem C-Bild Verfahren lässt sich auch dieser Parameter als Sklerosierung (Impedanzerhöhung) direkt subchondral sowie als „Begradigung“ (entspricht Makro- und Mikrorauhigkeit) des Knorpel - Knochenübergangs zeigen. Die statistische Auswertung zeigte, dass das Auftreten einer subchondralen Sklerosierung mit einer signifikanten Erhöhung der Knorpelimpedanz verbunden ist (siehe **Abbildung 4-12**). Dies steht scheinbar im Widerspruch zu der allgemein anerkannten und auch in dieser Arbeit bestätigten Hypothese, dass der mit zunehmenden Arthrosegrad verbundene Proteoglykanverlust zu einer Verringerung der Elastizität bzw. der akustischen Impedanz führt. Vielmehr deutet die fehlende Kolinearität zwischen Mankin-Score und dem Auftreten der subchondralen Sklerosierung darauf hin, dass

Proteoglykanverlust und subchondrale Sklerosierung nicht unmittelbar und zeitgleich auftreten.

Strukturelle Aspekte wie die Auffaserung der Knorpeloberfläche, Cluster- sowie Rissbildungen sind im akustischen Bild vergleichbar gut zu erkennen wie in der optischen Histologie.

### 5.1.3 Histologie und Immunhistochemie

Die Dünnschnitte für die histologische und immunhistochemische Beurteilung wurden zunächst in Paraffinschnitttechnik hergestellt. Im Verlauf stellte sich die Kryoschnitttechnik als bessere Alternative heraus. Beide Verfahren stellen Standardverfahren dar und werden routinemäßig angewendet. Auch die HE, Safranin-O und Tenascin-C Färbungen sind etablierte Verfahren und wurden nach gängigen Protokollen angefertigt.

Tenascin-C ist ein Protein, das sowohl während der Embryogenese in muskuloskelettalen Geweben als auch bei Heilungs- und Reparationsvorgängen exprimiert wird [21]. Es ist ein sehr guter Indikator für frühe arthrotisch induzierte Reparaturmechanismen [10]. Färbungen mit Tenascin-C Antikörpern stellen eine Möglichkeit dar, Knorpel auf arthrotische Veränderungen hin zu untersuchen (siehe 3.5).

Der Vergleich der beiden Scores hinsichtlich ihrer gemeinsamen Aussagekraft wird in Abschnitt 5.1.1 und **Abbildung 4-8** dargelegt.

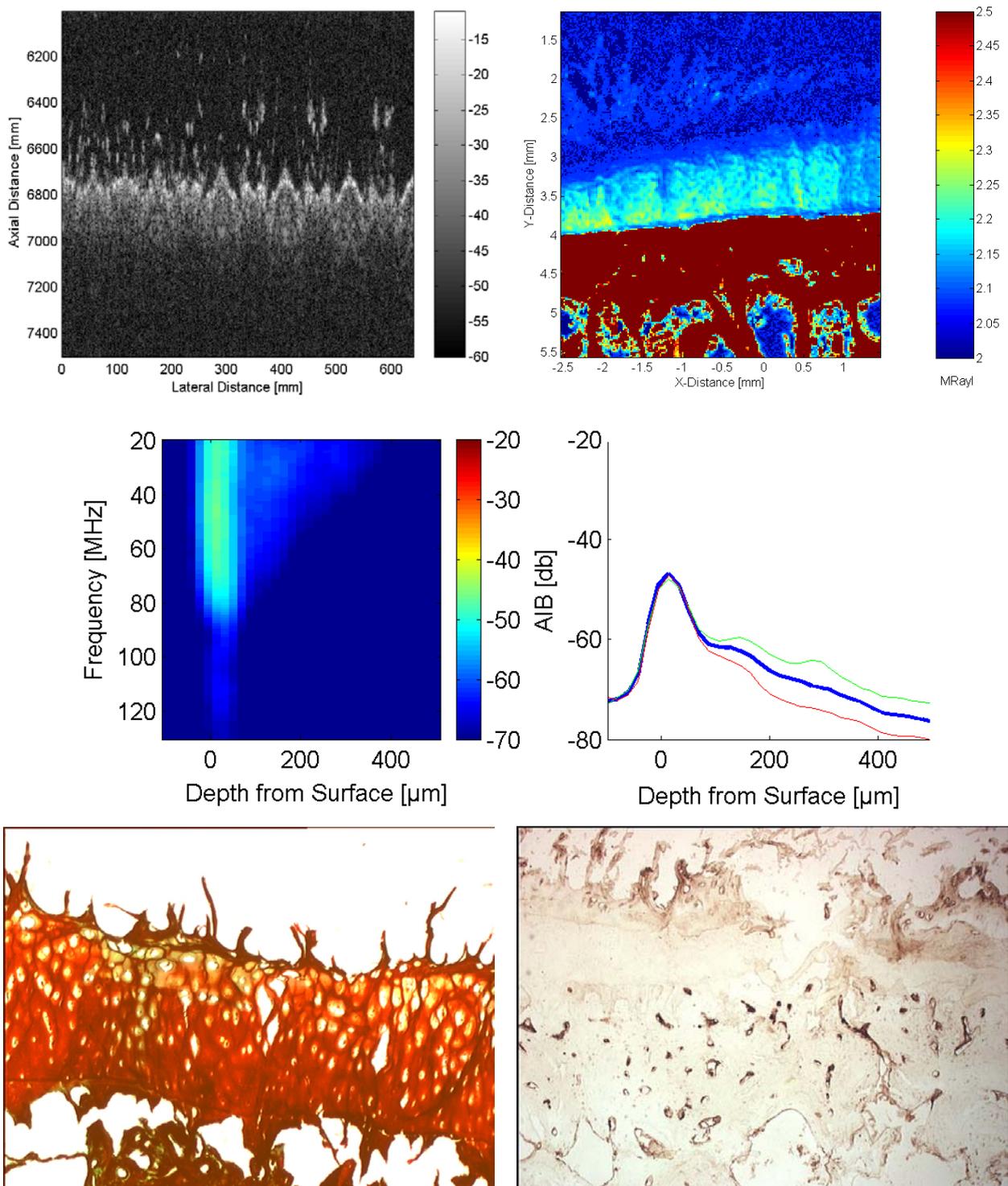
In der statistischen Auswertung erwies sich der Mankin-Score (siehe **Tabelle 3-1**) als sehr aussagekräftig. Der Wert des Mankin-Score (gesamt) hat einen signifikanten Einfluss auf das Auftreten einer subchondralen Sklerosierung und die Impedanz des Knochens. Der Proteoglykangehalt des Knorpels (Mankin III) hatte einen Einfluss auf die Gesamtimpedanz des Knorpels. Dies zeigt wie auch schon in anderen Arbeiten beschrieben, dass akustische Parameter mit dem Proteoglykangehalt des Knorpels in einem Zusammenhang stehen [16].

Der Tenascin-Score (siehe **Tabelle 3-2**) hatte einen signifikanten Einfluss auf die Impedanzen der knochennahen und mittleren Knorpelschicht, die mit steigendem Score kleiner wurden (siehe **Abbildung 4-11**), was heißt, dass der Knorpel weicher wird. Dies zeigt, dass die fallenden Impedanzen, die die Knorpelerweichung als bekannter Bestandteil des Krankheitsverlaufs beschreiben, und ein steigender Tenascin-Score als Maß für den Grad der Arthrose in einem deutlichen Zusammenhang stehen.

### 5.2 Vergleich der angewendeten Verfahren

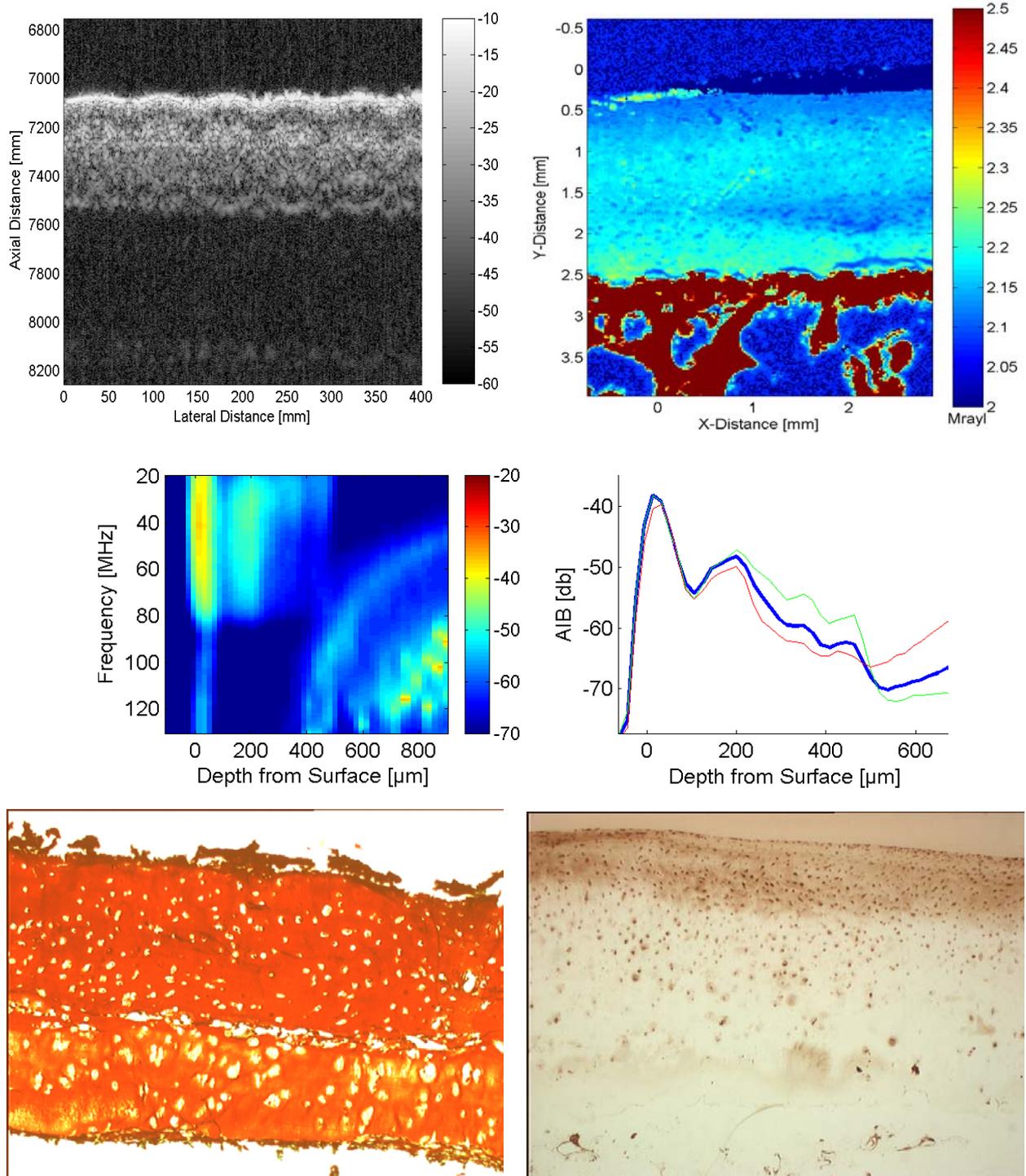
In **Abbildung 5-1** und **Abbildung 5-2** sind jeweils alle in dieser Arbeit angewendeten Verfahren und deren Ergebnisse an einer stark degenerierten Probe (**Abbildung 5-1**) und einer weniger stark degenerierten Probe (**Abbildung 5-2**) vergleichend dargestellt. Die charakteristischen arthrotischen Veränderungen wie die Auffaserung der Knorpeloberfläche, die Destruktion der Knorpelmatrix sowie die Abnahme der Knorpeldicke sind neben den hier beschriebenen Parametern wie das Charakteristikum des Rückstreusignals oder die subchondrale Sklerosierung in allen angewendeten Verfahren deutlich zu erkennen.

**Abbildung 5-1** zeigt die stärker degenerierte Probe. Im B-Bild (akustisches Schnittbild) links oben ist die Auffaserung der Oberfläche und eine breite Zone mit gleichmäßigem Rückstreusignal zu erkennen. Die tiefenabhängige Analyse der Rückstreuung (unter dem B-Bild dargestellt) zeigt ebenso ein schwaches Oberflächensignal und einen gleichmäßigen kontinuierlichen Abfall des Rückstreusignals ohne die deutliche Ausbildung eines Peaks (vergleiche auch **Abbildung 4-3** und **Abbildung 4-4**), was sich mit den statistischen Ergebnissen in **4.4** deckt (siehe auch **Abbildung 4-9**), die mit steigendem Arthrosegrad seltener das Auftreten eines Peaks im Rückstreusignal zeigen. Im C-Bild (rechts oben) sind strukturell ebenfalls die starke Auffaserung der Oberfläche, eine deutlich reduzierte Knorpeldicke im Vergleich zu **Abbildung 5-2** sowie tiefe Risse in der Knorpelmatrix zu erkennen. Es zeigen sich Regionen mit relativ hohen Impedanzen innerhalb des Knorpels (Mittelwert aller Knorpelproben: 2,14 Mrayl, mittlerer Impedanzwert dieser Probe: 2,15 Mrayl), einzelne Schichten sind nicht auszumachen. Hier nicht dargestellt ist die subchondrale Sklerosierung, die diese Probe aufwies. Die Probe hat im Mankin-Score (gesamt) einen Punktwert von 11/14 (5-2-3-1) bei einem Mittelwert von 9,54 Punkten für alle Proben (vergleiche **Tabelle 3-1** und Abschnitt **4.3**). Auch in der konventionellen Lichtmikroskopie sind die typischen arthrotischen Veränderungen zu erkennen. Die Oberfläche ist aufgefasert und der Knorpel zeigt tiefe Risse (in der HE-Färbung besser zu erkennen; Mankin I: 5/6), die Zellzahl ist vermehrt und die Zellen lagern sich zu Klonen zusammen (in der HE-Färbung besser zu erkennen; Mankin II: 2/3), in der Safranin-O Färbung links unten zeigt sich eine deutliche Reduktion des Proteoglykangehaltes (Mankin III: 3/4) und eine Tidemark war in der HE-Färbung nicht mehr auszumachen (Mankin IV: 1/1). Die Färbung mit Tenascin-C Antikörpern rechts unten zeigt eine deutliche Färbung des kompletten Knorpels (Tenascin-Score 3/3; vergleiche **Tabelle 3-2**).



**Abbildung 5-1** Vergleich der angewendeten Verfahren anhand einer stark degenerierten Probe; links oben: akustisches Schnittbild (B-Bild); darunter: tiefenabhängige Analyse der Rückstreumuster; rechts oben: Impedanzbild SAM (C-Bild); links unten: Safranin-O Färbung; rechts unten: Tenascin-C Antikörper Färbung; Erläuterung siehe Text.

**Abbildung 5-2** zeigt die weniger stark degenerierte Probe. Im B-Bild links oben zeigt sich eine weniger starke Auffaserung der Oberfläche und unter der Oberfläche ist das Rückstreusignal weniger homogen als in **Abbildung 5-1**. Die tiefenabhängige Rückstreuung (unter dem B-Bild dargestellt) zeigt ein deutlich höheres Signal von der Knorpeloberfläche und einen deutlichen Peak des Rückstreusignals bei 200  $\mu\text{m}$  (vergleiche **Abbildung 4-3** und **Abbildung 4-4**). Im C-Bild (rechts oben) ist zu erkennen, dass der Knorpel deutlich dicker ist als in **Abbildung 5-1**. Es stellen sich gut abgrenzbare Schichten mit unterschiedlichen Impedanzwerten dar (Mittelwert aller Proben: 2,14 Mrayl, Impedanzwert dieser Probe: 2,17 Mrayl). Die Knorpelschicht, die den Peak im B-Bild verursacht, ist am rechten Bildrand deutlich zu erkennen. Auch dies deckt sich mit den statistischen Ergebnissen in **4.4.1** (**Abbildung 4-9**), die zeigen, dass bei mittleren Werten des Mankin-Scores mehr Rückstreumaxima zu erwarten sind als bei höheren Scores (siehe **Abbildung 5-1**). Strukturell ist im C-Bild (rechts oben) eine glatte Knorpeloberfläche (am linken Bildrand auf der Knorpeloberfläche handelt es sich um Technovit) zu sehen. Der Knorpel weist keine Risse auf. Der Knorpel - Knochenübergang ist weniger gleichmäßig als der in **Abbildung 5-1** und passend dazu zeigt diese Probe auch keine signifikante subchondrale Sklerosierung (hier nicht dargestellt). Die Probe hatte im Mankin-Score (gesamt) einen Punktwert von 8/14 (4-2-1-1) bei einem Mittelwert von 9,54 Punkten für alle Proben (vergleiche **Tabelle 3-1** und Abschnitt **4.3**). Der Knorpel zeigte in der histologischen Aufarbeitung vereinzelte Risse bis zur mittleren Schicht (in der HE-Färbung besser zu erkennen; Mankin I: 4/6), die Zellen lagern sich in Gruppen zusammen (in der HE-Färbung besser zu erkennen; Mankin II: 2/3), in der Safranin-O Färbung links unten zeigte sich nur eine geringe Reduktion des Proteoglykangehaltes (Mankin III: 1/4) und die Tidemark war nicht mehr deutlich abzugrenzen (Mankin IV: 1/1). Die Färbung mit Tenascin-C Antikörpern rechts unten zeigte eine Färbung des Knorpels nur bis zur mittleren Schicht (Tenascin-Score 2/3; vergleiche **Tabelle 3-2**).



**Abbildung 5-2** Vergleich der angewendeten Verfahren anhand einer weniger stark degenerierten Probe; Darstellung analog **Abbildung 5-1** rechts unten handelt es sich um das Bild der Tenascinfärbung einer anderen Probe, die denselben Tenascin-Score aufwies.

---

## 6 SCHLUSSFOLGERUNG

Ziel der Arbeit war es, strukturelle und mechanische Veränderungen, die durch eine primäre Arthrose in Knorpel und Knochen entstehen, mit hochfrequenten Ultraschalltechniken zu charakterisieren und diese mit dem etablierten Verfahren der histologischen Beurteilung des Arthrosegrades durch den Mankin-Score zu vergleichen. Die Ergebnisse können eine mögliche Basis und Interpretationsgrundlage für die Erarbeitung eines objektiven Klassifizierungssystems für die unter der Arthroskopie prinzipiell anwendbare B-Bild Technik darstellen.

Durch Untersuchungen mit Ultraschall ist es möglich, quantifizierbare Parameter abzuleiten, die durch ihre Objektivität in der Vergleichbarkeit den bis jetzt subjektiven Einschätzungen arthrotischer Veränderungen durch den Operateur unter der Arthroskopie vor allem in frühen Stadien des Krankheitsgeschehens überlegen sind. Vorrichtungen zur intraartikulären Anwendung hochfrequenter Ultraschalltechniken wurden bereits entwickelt und experimentell in situ angewendet [26-28]. Es handelt sich hierbei allerdings um unfokussierte Ultraschallwandler, die mit mechanischen Indentern kombiniert wurden. Dadurch ist nur eine Bestimmung globaler Parameter möglich. Eine lokale Zuordnung zu den einzelnen Knorpelschichten oder eine Beurteilung von Zell- und Knorpelmatrizeigenschaften lässt sich mit diesem Verfahren nicht erreichen. Dies ist allerdings für eine verlässliche Interpretation und Entwicklung einer objektiven Beurteilung des Knorpels notwendig. Möglichkeiten dazu zeigt diese Arbeit auf. Mit den angewendeten Verfahren können typische und aus anerkannten und etablierten Verfahren wie der Histologie und der konventionellen Röntgentechnik bereits bekannte Zeichen der Arthrose sowohl auf struktureller wie auch auf mechanischer Ebene quantitativ dargestellt werden.

---

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden 28 bei der Knieendoprothetik anfallende Operationsresektate humaner Tibiaplateaus und eine Knotrolle aus dem Institut für Pathologie, die keine Zeichen einer Arthrose aufwies, untersucht.

Im ersten Teil der Arbeit wurden im B-Bild Verfahren (Rückstreumessung, akustisches Schnittbild) mit einem 80 MHz-Wandler Rückstreumessungen (entlang verschiedener Sagittallinien) des Tibiaplateaus vorgenommen, die unterschiedliche tiefenabhängige Rückstreumuster zeigten.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden von denselben Tibiaplateaus jeweils entlang drei medialer und drei lateraler Linien analog zu den im B-Bild Verfahren gemessenen Linien sechs Sagittalschnitte angefertigt, die mit Hilfe zeitaufgelöster akustischer Mikroskopie bei einer Frequenz von 50 MHz untersucht wurden. Es konnten aufgrund der Impedanzunterschiede unterschiedliche Knorpelschichten differenziert werden, wobei die knochennahe Schicht eine signifikant höhere Impedanz aufwies als die beiden oberflächlicheren Schichten. Innerhalb des Knochens war in 65,5 % der Fälle direkt subchondral eine signifikante Sklerosierung zu sehen.

Im dritten Teil der Arbeit wurden Histologien zur Beurteilung der Arthrose mit dem Mankin-Score angefertigt. Dazu wurden von jedem Sagittalschnitt eine HE-Färbung und eine Safranin-O Färbung hergestellt. Hinzu kamen immunhistochemische Färbungen mit Tenascin-C Antikörpern. Bei 0 bis 14 möglichen Punkten zeigte sich ein Mittelwert von 9,54 Punkten für den Mankin-Score und bei 0 bis 3 möglichen Punkten ein Mittelwert von 1,53 Punkten für den Tenascin-Score.

Die statistische Auswertung zeigte im Test auf Kolinearität der Faktoren Mankin-Score, Tenascin-Score, subchondrale Sklerosierung und Anzahl der Peaks im Rückstreusignal auf die gemessenen Ultraschallparameter, dass alle Parameter unterschiedliche Aussagen treffen. Als marginal signifikant zeigte sich ein fallender Mankin-Score mit steigender Anzahl der Rückstreumaxima im B-Bild.

Die Varianzanalyse der gemessenen Impedanzwerte im Knorpel und subchondralen Knochen zeigte für den Mankin-Score einen signifikanten Einfluss auf die Impedanz des Knochens. Auch auf das Auftreten einer subchondralen Sklerosierung hatte der Mankin-Score einen signifikanten Einfluss. Einen Einfluss auf die Impedanz des Knorpels konnte zwar nicht für den Mankin-Score (gesamt) gefunden werden, jedoch zeigte die Strukturkomponente des Mankin-Scores (Mankin I) einen signifikanten Einfluss auf die knochennahe Knorpelschicht und die Färbung mit Safranin-O (Proteoglykangehalt; Mankin III) einen signifikanten

Einfluss auf die mittlere Impedanz des gesamten Knorpels. Für den Tenascin-Score zeigte sich kein signifikanter Einfluss auf die mittlere Impedanz des gesamten Knorpels, jedoch auf die Impedanz der knochennahen und mittleren Zone, wobei die Impedanzen dieser Zonen mit steigendem Tenascin-Score immer kleiner wurden. Das bedeutet, dass der Knorpel weicher wird. Insgesamt lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass in dieser Arbeit ermittelte Ultraschallparameter in einem Zusammenhang mit herkömmlichen histologischen Kriterien für eine Arthrose stehen.

Die bekannte dreischichtige Struktur des Gelenkknorpels ist im SAM-Bild durch sich signifikant unterscheidende Impedanzwerte deutlich zu erkennen. In früheren Arthrostadien - bevor es zu einem Substanzabbau kommt – zeigt sich im B-Bild ein charakteristisches Rückstreusignal mit einem Maximum kurz unterhalb der Knorpeloberfläche. Dies geht jeweils mit mittleren Werten des Mankin-Scores einher. In niedrigeren Arthrostadien zeigen sich lediglich mehrere sehr kleine Peaks und in höheren Stadien verschwindet dieses Phänomen wieder. Es bieten sich mehrere Interpretationen dafür an. Der beobachtete Peak liegt zwischen 70  $\mu\text{m}$  und 280  $\mu\text{m}$  unterhalb der Knorpeloberfläche. Zum einen ist das die Region, in der bei Regenerationsversuchen des Knorpels das bekannte „Cloning“ auftritt, zum anderen liegt bei 200  $\mu\text{m}$  die Region, in der die Kollagenfasern vom horizontalen Verlauf in den vertikalen übergehen. Dass nun in mittleren Stadien hier eine Veränderung des Rückstreusignals auftritt kann im ersten Fall durch eine Veränderung der Matrixzusammensetzung, Zellverteilung und Zellzahlvermehrung während des Regenerationsversuches entstehen. Im zweiten Fall durch eine Veränderung der Kollagenfasern (z.B. Bruch, Auffaserung). Die plausibelste Erklärung dafür, dass der Peak bei höheren Arthrostadien wieder verschwindet, liegt darin, dass es in diesem Stadium der Erkrankung zur Reduktion der Knorpelmatrix kommt. Möglich wäre, dass bei den Untersuchungen die sonst als Peak erscheinende Schicht unterhalb der Knorpeloberfläche aufgrund des Substanzverlustes als Oberfläche detektiert wird. Genauere Aussagen sind mit den durchgeführten Messungen nicht zu treffen, da das Spektrum der untersuchten Fälle im Hinblick auf das Arthrostadium relativ eng begrenzt war und diese im Mittel bereits eine hohe Schädigung aufwiesen. In dieser Arbeit sollten Möglichkeiten zur Beschreibung von arthrotischen Veränderungen mit hochfrequenten Ultraschalltechniken aufgezeigt sowie Grundlagen für ein besseres Verständnis des unter der Arthroskopie anwendbaren B-Bild Verfahrens geboten werden. Weitere Untersuchungen mit einer höheren Probenzahl und gezielter Untersuchung der hier gefundenen Ultraschallcharakteristika sind notwendig, um die Ergebnisse zu validieren und in ihrem Auftreten und Ausmaß den entsprechenden

Arthrosestadien zuzuordnen. Das Potential hochfrequenter und hochauflösender Ultraschallverfahren zur Charakterisierung arthrotischer Veränderungen konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden. Perspektivisch ergibt sich somit die Möglichkeit, mit Hilfe von Ultraschall ein quantitatives und somit objektives Diagnoseverfahren zu entwickeln, welches eine minimalinvasive Beurteilung struktureller und mechanischer Veränderungen innerhalb der einzelnen Knorpelschichten in vivo erlaubt und welches in seiner Aussagekraft mit einer histologischen Beurteilung vergleichbar wird.

---

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Adler, R.S., Dedrick, D.K., Laing, T.J., Chiang, E.H., Meyer, C.R., Bland, P.H., Rubin, J.M.: Quantitative assessment of cartilage surface roughness in osteoarthritis using high frequency ultrasound; *Ultrasound In Medicine And Biology* 18 (1992) 51-58
- [2] Agemura, D.H., O'Brien, W.D., Jr., Olerud, J.E., Chun, L.E., Eyre, D.E.: Ultrasonic propagation properties of articular cartilage at 100 MHz; *J.Acoust.Soc.Am.* 87 (1990) 1786-1791
- [3] Bader, D.L., Kempson, G.E.: The short-term compressive properties of adult human articular cartilage; *Biomed.Mater.Eng* 4 (1994) 245-256
- [4] Bigelow, T.A., Oelze, M.L., O'Brien, W.D., Jr.: Estimation of total attenuation and scatterer size from backscattered ultrasound waveforms; *J.Acoust.Soc.Am.* 117 (2005) 1431-1439
- [5] Blackburn, W.D., Jr., Chivers, S., Bernreuter, W.: Cartilage imaging in osteoarthritis; *Semin.Arthritis Rheum.* 25 (1996) 273-281
- [6] Bucher, O. and Wartenberg, H.: *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen.* 12. Aufl. Verlag Hans Huber, Bern, 1997
- [7] Bush, P.G., Hall, A.C.: The volume and morphology of chondrocytes within non-degenerate and degenerate human articular cartilage; *Osteoarthritis.Cartilage.* 11 (2003) 242-251
- [8] Cherin, E., Saied, A., Laugier, P., Netter, P., Berger, G.: Evaluation of acoustical parameter sensitivity to age-related and osteoarthritic changes in articular cartilage using 50-MHz ultrasound; *Ultrasound In Medicine And Biology* 24 (1998) 341-354

- [9] Cherin, E., Saied, A., Pellaumail, B., Loeuille, D., Laugier, P., Gillet, P., Netter, P., Berger, G.: Assessment of rat articular cartilage maturation using 50-MHz quantitative ultrasonography; *Osteoarthritis. Cartilage*. 9 (2001) 178-186
- [10] Chevalier, X., Groult, N., Larget-Piet, B., Zardi, L., Hornebeck, W.: Tenascin distribution in articular cartilage from normal subjects and from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis; *Arthritis Rheum.* 37 (1994) 1013-1022
- [11] Clegg, D.O., Reda, D.J., Harris, C.L., Klein, M.A., O'Dell, J.R., Hooper, M.M., Bradley, J.D., Bingham, C.O., III, Weisman, M.H., Jackson, C.G., Lane, N.E., Cush, J.J., Moreland, L.W., Schumacher, H.R., Jr., Oddis, C.V., Wolfe, F., Molitor, J.A., Yocum, D.E., Schnitzer, T.J., Furst, D.E., Sawitzke, A.D., Shi, H., Brandt, K.D., Moskowitz, R.W., Williams, H.J.: Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis; *N.Engl.J.Med.* 354 (2006) 795-808
- [12] Eckstein, F., Schnier, M., Haubner, M., Priebisch, J., Glaser, C., Englmeier, K.H., Reiser, M.: Accuracy of cartilage volume and thickness measurements with magnetic resonance imaging; *Clin.Orthop.* (1998) 137-148
- [13] Engelhardt, M.: Epidemiologie der Arthrose in Westeuropa; *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 54 (2003) 171-175
- [14] Erggelet, C., Mandelbaum, B., Lahm, A.: Der Knorpelschaden als therapeutische Aufgabe - klinische Grundlagen; *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 51 (2000) 48-54
- [15] Felson, D.T., Zhang, Y., Anthony, J.M., Naimark, A., Anderson, J.J.: Weight loss reduces the risk for symptomatic knee osteoarthritis in women. The Framingham Study; *Ann.Intern.Med.* 116 (1992) 535-539
- [16] Foster, F.S., Pavlin, C.J., Harasiewicz, K.A., Christopher, D.A., Turnbull, D.H.: Advances in ultrasound biomicroscopy; *Ultrasound In Medicine And Biology* 26 (2000) 1-27

- [17] Grifka, J.: Kniegelenksarthrose. Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1994
- [18] Harasiewicz, K.A., Foster, F.S.: Ultrasound backscatter microscopy of articular cartilage in vitro; (1993) 981-984
- [19] Harasiewicz, K.A., Foster, F.S.: Ultrasound biomicroscopy and magnetic resonance imaging of reconstituted articular cartilage; (1997) 1149-1152
- [20] Hattori, K., Takakura, Y., Morita, Y., Takenaka, M., Uematsu, K., Ikeuchi, K.: Can ultrasound predict histological findings in regenerated cartilage?; Rheumatology.(Oxford) 43 (2004) 302-305
- [21] Herberholz, M.: Auswirkungen von Tenascin-C, -R und -C/R-Defizienz auf den skelettalen Phänotyp von Mäusen mit hohem Lebensalter; (2005)
- [22] Jaffre, B., Watrin, A., Loeuille, D., Gillet, P., Netter, P., Laugier, P., Saied, A.: Effects of antiinflammatory drugs on arthritic cartilage: a high-frequency quantitative ultrasound study in rats; Arthritis Rheum. 48 (2003) 1594-1601
- [23] Joiner, G.A., Bogoch, E.R., Pritzker, K.P., Buschmann, M.D., Chevrier, A., Foster, F.S.: High frequency acoustic parameters of human and bovine articular cartilage following experimentally-induced matrix degradation; Ultrason.Imaging 23 (2001) 106-116
- [24] Kladny, B., Beyer, W.F.: Nichtmedikamentöse konservative Therapie der Arthrose; Der Orthopäde 30 (2001) 848-855
- [25] Korhonen, R.K., Laasanen, M.S., Toyras, J., Lappalainen, R., Helminen, H.J., Jurvelin, J.S.: Fibril reinforced poroelastic model predicts specifically mechanical behavior of normal, proteoglycan depleted and collagen degraded articular cartilage; J.Biomech. 36 (2003) 1373-1379
- [26] Laasanen, M.S., Saarakkala, S., Toyras, J., Hirvonen, J., Rieppo, J., Korhonen, R.K., Jurvelin, J.S.: Ultrasound indentation of bovine knee articular cartilage in situ; J.Biomech. 36 (2003) 1259-1267

- [27] Laasanen, M.S., Toyras, J., Hirvonen, J., Saarakkala, S., Korhonen, R.K., Nieminen, M.T., Kiviranta, I., Jurvelin, J.S.: Novel mechano-acoustic technique and instrument for diagnosis of cartilage degeneration; *Physiol Meas.* 23 (2002) 491-503
- [28] Laasanen, M.S., Toyras, J., Vasara, A.I., Hyttinen, M.M., Saarakkala, S., Hirvonen, J., Jurvelin, J.S., Kiviranta, I.: Mechano-acoustic diagnosis of cartilage degeneration and repair; *J.Bone Joint Surg.Am.* 85-A Suppl 2 (2003) 78-84
- [29] Lai, W.M., Hou, J.S., Mow, V.C.: A triphasic theory for the swelling and deformation behaviors of articular cartilage; *J.Biomech.Eng* 113 (1991) 245-258
- [30] Leicht, S., Raum, K., Brandt, J.: Quantitative SAM investigation of changes in cartilage and subchondral bone due to primary arthrosis; *Technol.Health Care* 12 (2004) 174-176
- [31] Lyyra, T., Kiviranta, I., Vaatainen, U., Helminen, H.J., Jurvelin, J.S.: In vivo characterization of indentation stiffness of articular cartilage in the normal human knee; *J.Biomed.Mater.Res.* 48 (1999) 482-487
- [32] Mankin, H.J., Dorfman, H., Lipiell, L., Zarins, A.: Biochemical and Metabolic Abnormalities in Articular Cartilage from Osteoarthritic Human Hips .2. Correlation of Morphology with Biochemical and Metabolic Data; *Arthritis and Rheumatism* 14 (1971) 400-
- [33] Meulenbelt, I., Bijkerk, C., de Wildt, S.C., Miedema, H.S., Valkenburg, H.A., Breedveld, F.C., Pols, H.A., Te Koppele, J.M., Sloos, V.F., Hofman, A., Slagboom, P.E., van Duijn, C.M.: Investigation of the association of the CRTM and CRTL1 genes with radiographically evident osteoarthritis in subjects from the Rotterdam study; *Arthritis Rheum.* 40 (1997) 1760-1765
- [34] Mohr, W.: Arthrosis deformans. In: Doerr, Uehlinger, Seifert (Hrsg): *Spezielle Pathologie; Band 18/1 Gelenke und Weichteiltumoren.* Springer Verlag, Stuttgart 1984, S. 271-344

- [35] Narmoneva, D.A., Wang, J.Y., Setton, L.A.: Nonuniform swelling-induced residual strains in articular cartilage; *J.Biomech.* 32 (1999) 401-408
- [36] Narmoneva, D.A., Wang, J.Y., Setton, L.A.: A noncontacting method for material property determination for articular cartilage from osmotic loading; *Biophys.J.* 81 (2001) 3066-3076
- [37] Niethard, F. and Pfeil, J.: *Orthopädie.* 3. Aufl. Hippokrates Verlag, Stuttgart, 1997
- [38] Oliveria, S.A., Felson, D.T., Reed, J.I., Cirillo, P.A., Walker, A.M.: Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization; *Arthritis Rheum.* 38 (1995) 1134-1141
- [39] Outerbridge, R.E.: The etiology of chondromalacia patellae; *J.Bone Joint Surg.Br.* 43-B (1961) 752-757
- [40] Pellaumail, B., Watrin, A., Loeuille, D., Netter, P., Berger, G., Laugier, P., Saied, A.: Effect of articular cartilage proteoglycan depletion on high frequency ultrasound backscatter; *Osteoarthritis.Cartilage.* 10 (2002) 535-541
- [41] Pfander, D., Heinz, N., Rothe, P., Carl, H.D., Swoboda, B.: Tenascin and aggrecan expression by articular chondrocytes is influenced by interleukin 1beta: a possible explanation for the changes in matrix synthesis during osteoarthritis; *Ann.Rheum.Dis.* 63 (2004) 240-244
- [42] Pschyrembel: *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch.* 259. Aufl. de Gruyter, Berlin, 2001
- [43] Raum, K.: *Quantitative akustische Rastermikroskopiemethoden zur Charakterisierung der elastischen Eigenschaften von Knochengewebe;* (2002)
- [44] Raum, K., Leicht, S., Jaffre, B., Wohlrab, D., Göbel, F.: *Ultrasound biomicroscopy of articular cartilage;* (2005)

- [45] Raum, K., Reissauer, J., Brandt, J.: Frequency and resolution dependence of the anisotropic impedance estimation in cortical bone using time-resolved scanning acoustic microscopy; *J Biomed.Mater.Res.* 71A (2004) 430-438
- [46] Saied, A., Cherin, E., Gaucher, H., Laugier, P., Gillet, P., Floquet, J., Netter, P., Berger, G.: Assessment of articular cartilage and subchondral bone: subtle and progressive changes in experimental osteoarthritis using 50 MHz echography in vitro; *J.Bone Miner.Res.* 12 (1997) 1378-1386
- [47] Saied, A., Laugier, P., Chevrier, D.: Experimental osteoarthritic articular cartilage: In vitro visualisation of lesions and three-dimensional surface reconstruction using 50 MHz ultrasound microscope; (1994) 1475-1478
- [48] Sharma, L., Kapoor, D., Issa, S.: Epidemiology of osteoarthritis: an update; *Curr.Opin.Rheumatol.* 18 (2006) 147-156
- [49] Swoboda, B.: Aspekte der epidemiologischen Arthroseforschung; *Der Orthopäde* 11 (2001) 834-840
- [50] Theiler, R.: Arthrose - Epidemiologie, Diagnose und Differentialdiagnose, Abklärung und Dokumentation; *Schweiz Med Forum* 23 (2002) 555-561
- [51] Veje, K., Hyllested-Winge, J.L., Ostergaard, K.: Topographic and zonal distribution of tenascin in human articular cartilage from femoral heads: normal versus mild and severe osteoarthritis; *Osteoarthritis.Cartilage.* 11 (2003) 217-227
- [52] Wilson, W.D.: Speed of Sound in Sea Water As A Function of Temperature, Pressure, and Salinity; *Journal Of The Acoustical Society Of America* 32 (1960) 641-644

---

## 9 THESEN

1. Die Arthrose als eine der häufigsten Gelenkerkrankungen stellt sowohl eine erhebliche individuelle Beeinträchtigung für den Patienten als auch eine hohe sozioökonomische Belastung dar. Zum Zeitpunkt, an dem mit herkömmlichen Verfahren eine Arthrose diagnostiziert werden kann, kommt in vielen Fällen nur noch der alloplastische Gelenkersatz als Therapie in Frage. Daher besteht die substantielle Notwendigkeit, Methoden der Früherkennung zu finden, die Grundlage für die Entwicklung einer Therapie im Frühstadium bieten.
2. Mit hochfrequenten Ultraschalltechniken können Gewebsstrukturen mit einer hohen örtlichen Auflösung gewebeerhaltend dargestellt werden. Dadurch bietet sich die Möglichkeit zur Anwendung *in vivo*.
3. Bei Rückstremessungen im B-Bild Verfahren mit einem 80 MHz-Wandler zeigten sich an den nativ untersuchten Tibiaplateaus innerhalb des Knorpels charakteristische tiefenabhängige Rückstremuster.
4. Mit dem C-Bild Verfahren mit einem 50 MHz-Wandler an Sagittalschnitten der mit dem B-Bild Verfahren voruntersuchten Proben konnten arthrosespezifische mechanische und strukturelle Veränderungen festgestellt werden, womit die zuvor im B-Bild Verfahren mit einem 80 MHz-Wandler gefundenen Charakteristika örtlich zugeordnet werden konnten. Es konnte die bekannte Dreischichtung des Knorpels durch signifikant unterschiedliche Impedanzwerte in den einzelnen Schichten gezeigt werden. Im subchondralen Knochen war in 65,5 % der Fälle eine signifikante subchondrale Sklerosierung zu sehen.
5. In der Beurteilung der Histologien nach dem Mankin-Score ergab sich ein Mittelwert von 9,54 Punkten (bei 0 bis 14 möglichen). Der Mankin-Score (gesamt) hatte keinen signifikanten Einfluss auf die über alle Zonen gemittelte Impedanz des Knorpels ( $F = 1,03$ ,  $p = 0,43$ ), der Proteoglykangehalt des Knorpels (Mankin III) zeigte jedoch einen signifikanten Einfluss auf die mittlere Impedanz des gesamten Knorpels ( $F = 2,51$ ,  $p = 0,05$ ). Auch konnte für die Strukturkomponente (Mankin I) ein signifikanter Einfluss auf die Impedanz der gelenkbinnenraumnahen Knorpelschicht ( $F = 5,06$ ,  $p = 0,0002$ ) festgestellt werden. Insgesamt lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass in dieser

Arbeit ermittelte Ultraschallparameter in einem Zusammenhang mit herkömmlichen histologischen Kriterien für eine Arthrose stehen.

6. Die Untersuchung der immunhistochemischen Färbungen mit Tenascin-C Antikörpern ergab einen Mittelwert von 1,53 Punkten (bei 0 bis 3 möglichen). Es zeigte sich ein signifikanter Einfluss auf die Impedanz der knochennahen und der mittleren Knorpelschicht mit  $F = 4,06$  bzw.  $5,79$  und  $p = 0,01$  bzw.  $0,002$ . Die Impedanzen wurden kontinuierlich kleiner mit steigendem Score, wobei der Unterschied zwischen dem niedrigsten und dem höchsten Wert in beiden Zonen signifikant war.
7. Die statistische Auswertung zeigte im Test auf Kolinearität der Faktoren Mankin-Score, Tenascin-Score, subchondrale Sklerosierung und Anzahl der Peaks im Rückstreusignal auf die gemessenen Ultraschallparameter, dass alle Parameter unterschiedliche Aussagen treffen. Da diese Parameter größtenteils bekannte Vorgänge im Arthrosegeschehen charakterisieren, wird vermutet, dass diese nicht zeitgleich auftreten.
8. In früheren Arthrostadien - bevor es zum Substanzabbau kommt – zeigt sich im B-Bild ein charakteristisches Rückstreusignal mit einem Maximum zwischen  $70\ \mu\text{m}$  und  $280\ \mu\text{m}$  unterhalb der Knorpeloberfläche. In niedrigeren Arthrostadien zeigen sich lediglich mehrere sehr kleine Peaks und in höheren Stadien verschwinden diese wieder. In dieser oberflächennahen Region tritt bei Regenerationsversuchen des Knorpels das bekannte „Cloning“ auf. Das Auftreten des Peaks in mittleren Stadien kann durch eine Veränderung der Matrixzusammensetzung, Zellverteilung und Zellzahlvermehrung während des Regenerationsversuches entstehen. In höheren Stadien, wenn der Knorpelverlust eintritt, wird diese Schicht dann als Oberfläche detektiert.
9. Weitere Untersuchungen mit einer höheren Probenzahl und einer größeren Spanne an Arthrosegraden sind notwendig, um die Ergebnisse zu validieren und in ihrem Auftreten und Ausmaß den entsprechenden Arthrostadien zuzuordnen.
10. Das Potential hochfrequenter Ultraschallverfahren zur Charakterisierung arthrotischer Veränderungen konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden. Perspektivisch ergibt sich die Möglichkeit, mit Hilfe von Ultraschall ein quantitatives und somit objektives Diagnoseverfahren zu entwickeln, welches eine minimalinvasive Beurteilung

struktureller und mechanischer Veränderungen innerhalb der einzelnen Knorpelschichten in vivo erlaubt und welches in seiner Aussagekraft der einer histologischen Beurteilung nahe kommt.

---

## LEBENS LAUF

**Name** Sonja Kerstin Leicht  
**Geburtsdatum/-ort** 10.07.1977, Stuttgart  
**Staatsangehörigkeit** deutsch

**Schulbildung** 1984-1988 Schönenberg-Grundschule Ulm  
1988-1997 Kepler-Gymnasium Ulm mit Abschluss Abitur

**Studium** 1998-2005 Studium der Humanmedizin an der  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
03/2001 Ärztliche Vorprüfung  
04/2002 Erstes Staatsexamen  
03/2004 Zweites Staatsexamen  
11/2005 Drittes Staatsexamen  
12/2005 Approbation

### **Famulaturen**

08/2001 Allgemein Chirurgie (Berufsgenossenschaftliche  
Kliniken Bergmannstrost, Halle)  
07/2002 Neurologie (MLU Halle)  
03/2003 Orthopädie (MLU Halle)  
09/2003 Kinderchirurgie (MLU Halle)

### **Praktisches Jahr**

10/04-01/05 Klinik für Orthopädie der MLU Halle  
01/05-05/05 Klinik für Innere Medizin der  
Berufsgenossenschaftlichen Kliniken Bergmannstrost,  
Halle  
05/05-09/05 Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie der  
Berufsgenossenschaftlichen Kliniken Bergmannstrost,  
Halle

<b>Promotion</b>	seit 01/2001	Promotion an der Klinik für Orthopädie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bei Prof. Dr. med. Werner Hein
	2002/2003	jeweils 4-wöchiger Forschungsaufenthalt am Laboratoire d'Imagerie Paramétrique, Université Pierre et Marie Curie, Sorbonne, ParisVI, Frankreich
<b>Qualifikationen</b>	08/97-11/97	Aufenthalt in Flint, Michigan, USA Ausbildung zur Schwesternhelferin am MOTT Community College, Flint Pflegepraktikum im Genesis Health Park, Flint
	01/98-05/98	Ausbildung zur Rettungssanitäterin an der DRK Landesrettungsschule, Münster
	07/98-11/98	Anstellung als Rettungssanitäterin in Hamburg

Halle, den 10.07.2006

---

## **SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Halle, den 10.07.2006

---

## **ERKLÄRUNG ÜBER FRÜHERE PROMOTIONSVERSUCHE**

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle, den 10.07.2006

---

## VERÖFFENTLICHUNGEN VON ERGEBNISSEN

- Konferenzbeiträge** 2003 Leicht S., Raum K. and Brandt J., "Quantitative SAM investigation of changes in cartilage and subchondral bone due to primary arthrosis," 7th Conference of the European Society for Engineering and Medicine, Sept. 18-21, 2003, Halle, Germany.
- 2004 Raum K., Leicht S., Jaffré B., Wohlrab D. and Göbel F., "Ultrasound BioMicroscopy of articular cartilage," 2nd World Congress on Regenerative Medicine, May 18-20, 2004, Leipzig, Germany
- Publikationen** 2003 Leicht S., Raum K. and Brandt,J., "Quantitative SAM investigation of changes in cartilage and subchondral bone due to primary arthrosis," in Technology and Health Care, vol. 12(2), 174-176, 2003.

---

## **DANKSAGUNG**

Herrn Prof. Dr. med. Werner Hein danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas und seine freundliche Unterstützung.

Dr. rer. nat. Kay Raum danke ich für die technische Einarbeitung und Beratung bei der Durchführung und Auswertung der Messungen. Ich danke ihm für seine unermüdliche Unterstützung, seine zahlreichen Anregungen und Vorschläge und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Dr. med. Jörg Brandt danke ich für die Ausarbeitung der Themenstellung und seine Beratung bei der Beurteilung der Histologien.

Frau Angela Rosemeier, Frau Bettina Schneider und Frau Cornelia Vetter danke ich für die tatkräftige Hilfe in allen labortechnischen Belangen und die Herstellung der Histologien.

Ich danke allen, die mit der Überarbeitung und Diskussion des Manuskriptes zur Fertigstellung der Arbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Großvater, die meine Ausbildung ermöglicht haben, und meinen Geschwistern und meiner Mutter für ihr geduldiges Zuhören, ihre aufmunternden Worte und ihre Unterstützung.