

Aus der
Orthopädischen Universitätsklinik mit Poliklinik Tübingen

**Arthroskopische Anwendung von Autofluoreszenz des
Gelenkknorpels zur Quantifizierung von Knorpelschäden
im Kniegelenk**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Scheibe, Vivien Evamaria Alexandra

2022

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. U. K. Hofmann

2. Berichterstatter: Professor Dr. A. Nüssler

Tag der Disputation: 28.09.2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Anatomie des Kniegelenks	2
1.1.1 Makroskopische Anatomie.....	2
1.1.2 Mikroskopische Anatomie des Knorpels	5
1.2 Pathologien des Gelenkknorpels.....	9
1.2.1 Chondropathie	9
1.2.2 Gonarthrose.....	18
1.3 Arthroskopie	21
1.4 Optische Darstellung und Fluoreszenz des Knorpels.....	22
1.4.1 Optische Darstellung	22
1.4.2 Fluoreszenzverhalten des Knorpels.....	22
1.4.3 Bisherige Anwendung der Fluoreszenz in der Medizin	24
1.5 Ziele	25
2 Material und Methoden.....	27
2.1 Arthroskopie	27
2.1.1 Kadaverpräparate	27
2.1.2 Präparation der Kadaverknie	27
2.1.3 Verwendete Arthroskopiegeräte	29
2.1.4 Durchführung der Arthroskopie.....	34
2.1.5 Datenerfassung der arthroskopischen Knorpelschäden	37
2.1.6 Knorpelgewinnung für die histologischen Versuche	38
2.1.7 Auswertung der Knorpelschäden im Zuge der Arthroskopie.....	39
2.2 Histologische Kontrollversuche	41
2.2.1 Fixierung.....	41
2.2.2 Entkalken.....	41
2.2.3 Schneiden am Kryotom	41
2.2.4 DAPI-Färbung.....	44

2.2.5	Aufnahme von Mosaikbildern am Laser Scanning Mikroskop	48
2.2.6	Auswertung der Knorpelschäden auf histologischer Ebene.....	50
2.3	Statistische Methoden	51
2.3.1	Befundungsqualität.....	51
2.3.2	Objektivität.....	52
2.3.3	Auswertung der Defekterkennung	52
2.3.4	Vergleich Programm Standard / Chroma.....	53
2.3.5	Reliabilität	53
2.3.6	Vergleich mit histologischer Kontrolle	54
3	Ergebnisse	55
3.1	Befundungsqualität.....	55
3.1.1	Objektivität.....	58
3.2	Auswertung der Defekterkennung.....	59
3.2.1	Klassifikation nach Outerbridge	59
3.2.2	Fissuren.....	61
3.2.3	Größe	62
3.2.4	Vergleich Programm Standard / Chroma.....	63
3.3	Reliabilität.....	64
3.3.1	Interraterreliabilität	64
3.3.2	Intraraterreliabilität	67
3.4	Vergleich mit histologischer Kontrolle.....	69
4	Diskussion.....	82
4.1	Hintergrund	82
4.2	Methodenkritik.....	83
4.2.1	Arthroskopie.....	83
4.2.2	Histologische Versuche	84
4.3	Ergebnisse	85
4.3.1	Befundungsqualität	85
4.3.2	Auswertung der Defekterkennung	88

4.3.3	Reliabilität	89
4.3.4	Vergleich mit histologischer Kontrolle	91
4.4	Limitationen	93
4.5	Schlussfolgerungen	94
5	Zusammenfassung	95
	Abbildungsverzeichnis	96
	Tabellenverzeichnis	98
	Literatur	99
	Erklärung zum Eigenanteil	
	Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

ACT	autologe Chondrozytentransplantation
AF	Autofluoreszenz
ALA	5-Aminolävulinsäure
AMIC	autologe matrixinduzierte Chondrogenese
ASK	Arthroskopie
BMI	Body-Mass-Index
CT	Computertomographie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZM	Extrazellulärmatrix
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FLASH	Fast-low-angle-shot
FSE	Fast-Spin-Echo
GAG	Glykosaminoglykan
GAGs	Glykosaminoglykane
HP	Hydroxylysylpyridinolin
ICG	Indocyanidgrün
ICRS	International Cartilage Repair Society
LED	lichtemittierende Diode
LP	Lysylpyridinolin
LSM	Laser Scanning Mikroskop
MACT	matrixassoziierte autologe Chondrozytentransplantation
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MRT	Magnetresonanztomographie
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-H
NIR	Nahinfrarot
NIRS	Nahinfrarotspektroskopie
OATS	autologe osteochondrale Transplantation
OCL	osteochondrale Läsionen
OCT	optical coherence tomography

PBSPhosphate Buffered Saline
PDTphotodynamische Therapie
PFAParaformaldehyd
RNS.....Ribonukleinsäure
SPGR3D-spoiled-Gradienten-Echo
UVUltraviolett
WHOWorld Health Organization

1 Einleitung

Das Fachgebiet der Orthopädie beschäftigt sich mit den Pathologien des Bewegungsapparates. Ein häufiges Krankheitsbild der Orthopädie stellt der Knorpelschaden, auch Chondropathie genannt, dar. Knorpelschäden können an allen Gelenken des Körpers vorkommen. Vermehrt sind dabei Gelenke betroffen, welche starker mechanischer Belastung ausgesetzt sind, wie das Knie.

Bei der Chondropathie handelt es sich um eine pathologische Ausdünnung des Gelenkknorpels mit einhergehender Strukturveränderung. Es gibt ein breites Spektrum möglicher Ursachen wie Traumata, frühe Formen degenerativer Knorpelschäden oder die Osteochondrosis dissecans. Schäden am Knorpel können zu starken Schmerzen und Bewegungseinschränkungen führen [31, 95]. Die Problematik von Erkrankungen des Gelenkknorpels besteht in der insuffizienten Regenerationsfähigkeit. Es gibt jedoch knorpelregenerative und Knorpelersatztherapien.

Es gibt verschiedene Klassifikationssysteme für Schäden am Gelenkknorpel, mit Hilfe derer sich das Ausmaß des Knorpelschadens in verschiedene Grade einteilen lässt. Je nach Grad an Schaden werden entsprechende Therapieoptionen empfohlen. Folglich hat die Einteilung große Konsequenzen für die weitere Therapie [31].

Grundlage für die Klassifikation ist die Bildgebung. Dies geschieht entweder durch ein Röntgenbild, eine MRT-Aufnahme oder in der diagnostischen Arthroskopie. Je präziser die Beurteilung des Knorpelschadens möglich ist, desto differenzierter kann die Einteilung des Schadens erfolgen. Für eine zielgerichtete und erfolgreiche Therapie muss die Klassifikation so exakt wie möglich mit der tatsächlichen Ausprägung des Schadens übereinstimmen. Goldstandard für die Klassifikation von Knorpelschäden ist derzeit die diagnostische Arthroskopie unter Weißlicht [44].

Einleitung

1.1 Anatomie des Kniegelenks

1.1.1 Makroskopische Anatomie

Aus makroskopischer Sicht ist das Kniegelenk des Menschen ossär aus drei miteinander artikulierenden Knochen aufgebaut: Femur, Patella und Tibia. Das Femur artikuliert mit der Patella im Femoropatellargelenk (Articulatio femoropatellaris) und über das Femorotibialgelenk (Articulatio femorotibialis) mit der proximalen Tibia. Die Tibia artikuliert außerdem proximal mit dem lateral der Tibia liegenden Fibulaköpfchen. Das benachbarte Gelenk zwischen Tibia und Fibula wird nicht zum Kniegelenk gezählt. Zwischen Femur und Tibia liegen die Kreuzbänder und die Menisken. Der gelenkige Kontakt zwischen Femur und Patella befindet sich im Bereich des patellofemorales Gleitlagers, das ventral der Femurkondylen und dorsal der Patella liegt. Die Kontaktfläche beträgt ca. 3 cm² [44].

Die Patella ist funktionell als Sesambein einzuordnen. Da die Patella mit der Quadrizepssehne fest verwachsen ist, bewegt sie sich bei Beugung und Streckung im Kniegelenk stets mit. Dabei legt sie eine Strecke von fünf bis sieben Zentimetern zurück. In Beugestellung befindet sich die Patella in der Fossa intercondylaris des Femurs, in Streckung ist sie an apikaler Stelle der Femurkondylen lokalisiert. Die Facies articularis der Patella zeigt zum Femur und ist mit Knorpel überzogen [84].

Die Gelenkfläche des Femurs besteht aus der mit Gelenkknorpel überzogenen medialen und lateralen Kondyle, sie vereinigen sich ventral zur Facies patellaris femoris. Zwischen den Femurkondylen befindet sich die Fossa intercondylaris. Proximal der Kondylen befinden sich am Femur der Epicondylus lateralis und medialis. An ihnen setzen unter anderem die Kollateralbänder und muskuläre Strukturen an (Abbildung 2) [84].

Bei Beugung und Streckung im Kniegelenk rollen sich die Femurkondylen auf dem Tibiaplateau ab. Ab 25° Beugung gleiten die Femurkondylen nach dorsal. Als Tibiaplateau werden die überknorpelten Anteile der Tibiakondylen bezeichnet, welche im Kniegelenk mit dem Femur artikulieren. Zwischen dem medialen und lateralen Anteil des Tibiaplateaus befinden sich die Eminentia

Einleitung

intercondylaris sowie die Area intercondylaris anterior und posterior. In diesem Bereich liegt der Ursprung der Kreuzbänder und Menisken.

Die Menisken des Knies sind mobile Gelenkpfannen aus Faserknorpel. Sie gleichen die Inkongruenzen zwischen den Condylen des Femurs und dem Tibiaplateau aus und verteilen dadurch den auf den Gelenkflächen lastenden Druck. Bei Flexion verschieben sich die Menisken nach dorsal, und bei Extension nach ventral. Bei Rotation drehen sie in Bewegungsrichtung um die Basis, wobei der laterale Meniskus ein größeres Bewegungsausmaß aufweist als der mediale. Der mediale Meniskus ist mit dem medialen Kollateralband verwachsen, welches wiederum mit der Gelenkkapsel verwachsen ist. Die Verwachsung ist die Ursache für die reduzierte Beweglichkeit des Innenmeniskus in Gegensatz zum Außenmeniskus (Abbildung 1) [84].

Zu den Kollateralbändern gehört das Innen- und das Außenband, die von den Epikondylen des Femurs zur Tibia verlaufen. Sie sind in Extensionsstellung gespannt und verhindern die Aufklappbarkeit des Knies nach medial und lateral. Sie begrenzen außerdem die endgradige Rotation.

Die Innenrotation wird vor allem durch das vordere und hintere Kreuzband begrenzt. Die Kreuzbänder dienen der Stabilisation des Gelenks während der Bewegung und verhindern die Translation. Wie bereits erwähnt, liegt der knöcherne Ursprung in der Area intercondylaris. Das vordere Kreuzband verläuft vom lateralen Femurcondylus nach ventral und inseriert dort an der Tibia. Das hintere Kreuzband hat den Ursprung ventral am medialen Condylus und den Ansatz weiter dorsal am Tibiaplateau. Sie liegen intrakapsulär und extraartikulär. Die Gelenkkapsel besteht aus Bändern und Sehnen, welche das Gelenk von der Umgebung abgrenzen. Durch das Umschlagen der Kapselwand entstehen drei Recessus, der Recessus suprapatellaris, Recessus subpopliteus und Recessus subtendinea gastrocnemii. In der Kapsel befindet sich der Hoffa'sche Fettkörper [84].

Einleitung

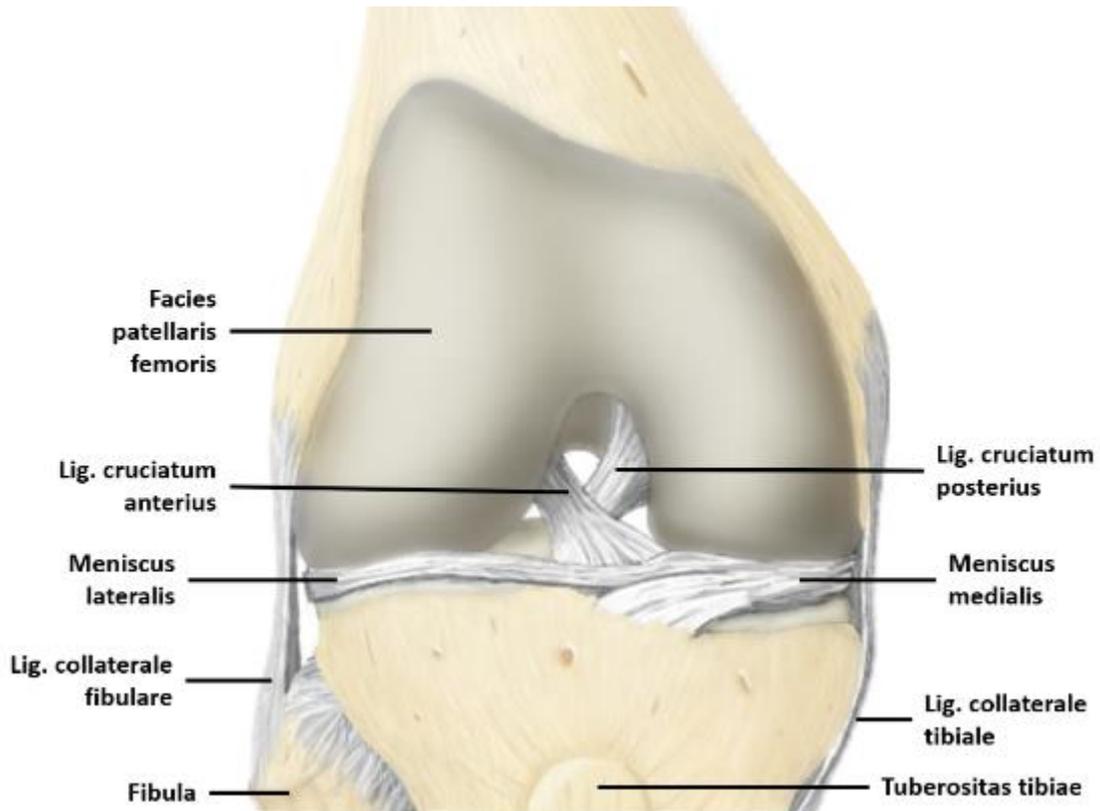


Abbildung 1: Bandapparat des rechten Knies in Extension von ventral (modifiziert nach: [84])

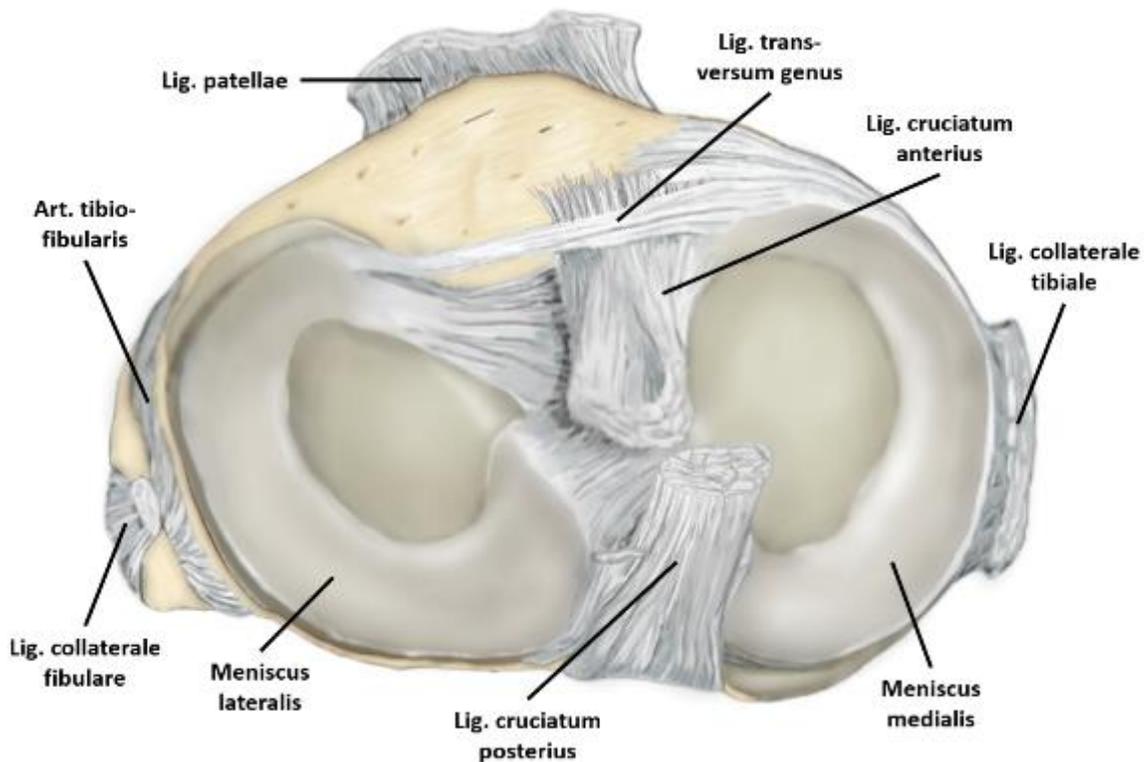


Abbildung 2: Tibiaplateau des linken Knies mit Menisken, Kreuzbändern und Seitenbändern (modifiziert nach: [84]).

1.1.2 Mikroskopische Anatomie des Knorpels

Gelenkknorpel dient dem reibungsarmen Gleiten der Gelenkoberflächen und dem Schutz des Knochens. Über den Knorpel werden Krafteinwirkungen zwischen den Gelenkkomponenten übertragen. Gelenkknorpel soll Druck, Scher- und Reibungskräfte abfangen [31].

Gelenkknorpel besteht aus hyalinem Knorpel. Ausdifferenzierter hyaliner Knorpel besteht nur aus wenig Chondrozyten, zu 1 – 10 %. Den größten Anteil am Knorpel bildet die Interzellulärsubstanz, auch Extrazellulärmatrix (EZM), welche hauptsächlich aus Wasser besteht. Gelenkknorpel besteht zu 70 % aus Wasser. Neben Wasser wird die EZM aus Proteoglykanen, Kollagenen, vor allem Kollagen II [21], Glykosaminoglykanen (GAGs), Glykoproteinen, Lipiden und Elektolyten gebildet [71].

GAGs sind für den hohen Wasseranteil des hyalinen Knorpels verantwortlich. Sie sind stark sauer, wodurch sie bevorzugt Kationen und Wasser als partiell positiv geladenes Dipol binden. Durch ihre negativ geladenen Karboxyl- und Sulfatgruppen interagieren GAGs außerdem elektrostatisch mit Kollagen. Die wichtigsten GAGs des Gelenkknorpels sind Hyaluronat, Chondroitinsulfat und Keratansulfat. Das Hyaluronat ist das einzige GAG, welches nicht sulfatiert ist. Es ist ein wichtiger Bestandteil der Synovia [3, 83].

Glykoproteine sind Adhäsionsproteine, welche unter anderem Zellen in der EZM verankern. Ein wichtiges Glykoprotein ist das Chondronektin, welches Chondrozyten an Kollagen haften lässt. Die Struktur der Proteoglykane besteht aus einem Kernprotein und vielen an das Kernprotein geknüpften GAGs. Das wichtigste Proteoglykan im Knorpel ist das Aggrekan (Abbildung 3 A). Aggrekan besteht aus den GAGs Chondroitinsulfat und Keratansulfat, welche an das Kernprotein gebunden sind. Das Glykoprotein Hyaluronektin verbindet viele Aggrekanmonomere mit Hyaluronat zu einem Komplex (Abbildung 3 B) [83].

Einleitung

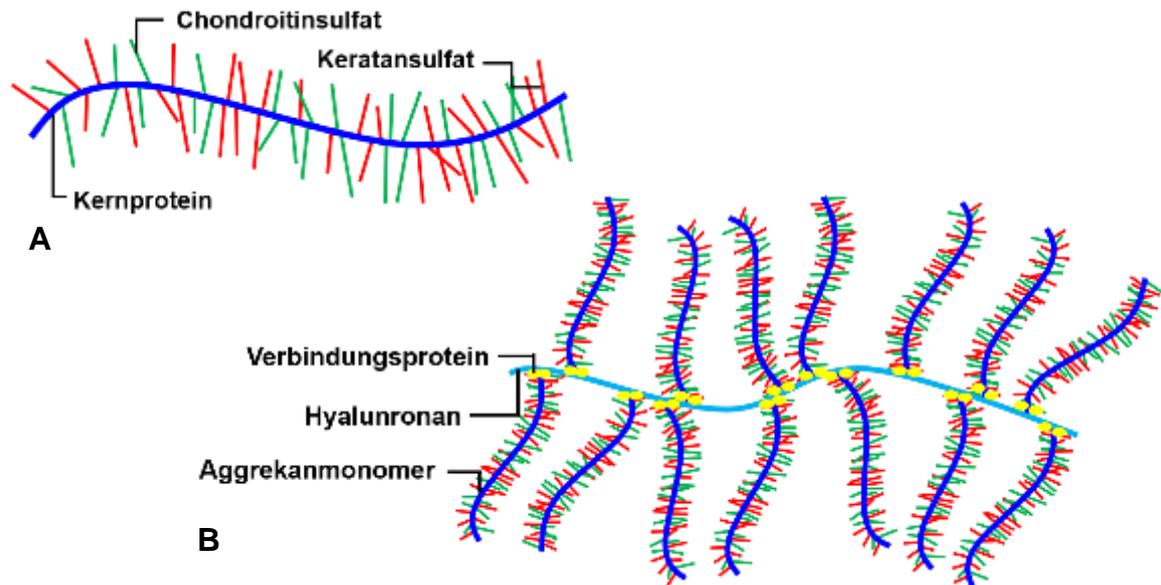


Abbildung 3: Aggrecan-Komplex.

A: Aggrecanmonomer. B: Aggrecanmonomere mit Hyaluronat verbunden.

Durch das Zusammenwirken von Proteoglykanen und Kollagenfibrillen erhält der Knorpel seine Druck- und Biegeelastizität. Die Kollagenfasern hindern die Proteoglykane an der vollständigen Ausbreitung, wodurch die Fasern in Ruhe stets unter Spannung stehen. Die „viskoelastischen Eigenschaften“ [83] des Knorpels entstehen durch die hohe Wasserbindungskapazität der negativ geladenen Aggrecan-Hyaluronat-Komplexe und den damit verbundenen hohen Wasseranteil des Knorpelgewebes. Die mit Wasser beladenen GAGs stoßen sich gegenseitig ab. Infolgedessen wird ein Innendruck aufgebaut, der durch Kollagen II gehalten wird. Dadurch entsteht die Druckelastizität des Knorpelgewebes [3]. Lastet Druck auf dem Knorpel, werden Proteoglykane und Kollagen komprimiert. Dabei strömt Wasser aus dem Knorpel. Bei Druckentlastung wird das Wasser von den Proteoglykanen wieder so weit aufgesogen, wie es die Kollagenfasern zulassen, sodass die Grundspannung der Proteoglykane und die Ausgangsform des Knorpels wieder hergestellt werden [79]. Die Aggrecan-Hyaluronat-Komplexe sind in ein großes formgebendes Netz aus Kollagenfasern eingebunden [44]. Im hyalinen Knorpel findet sich vor allem Kollagen vom Typ II [21]. Kollagene sind aus einer rechtsgängigen Tripelhelix aufgebaut, welche aus drei linksgängigen Kollagen- α -Ketten besteht. Die kollagenen Fasern liegen in hyalinem Knorpel maskiert vor.

Einleitung

Die Struktur des hyalinen Knorpels besteht im Wesentlichen aus Chondronen mit Chondrozyten und der interterritorialen Matrix, welche die EZM mit Proteoglykanen und Kollagenfibrillen enthält (Abbildung 5). Hyaliner Gelenkknorpel ist in verschiedene Zonen aufgeteilt. Zuerst liegt die Tangentialzone, darunter die Übergangszone und die Radiärzone. Die Benennung der Zonen richtet sich nach der Verlaufsrichtung der Kollagenfasern. In der obersten Schicht des Knorpels verlaufen die Fasern tangential, während sie in der untersten Schicht vertikal angeordnet sind. Die interzelluläre Matrix wird von den Chondrozyten gebildet. Zwischen der Radiär- und Mineralisationszone liegt die Tidemark. Sie bildet die Grenze zum verkalkten Knorpelgewebe. Unterhalb der Mineralisationszone beginnt subchondraler Knochen (Abbildung 4).

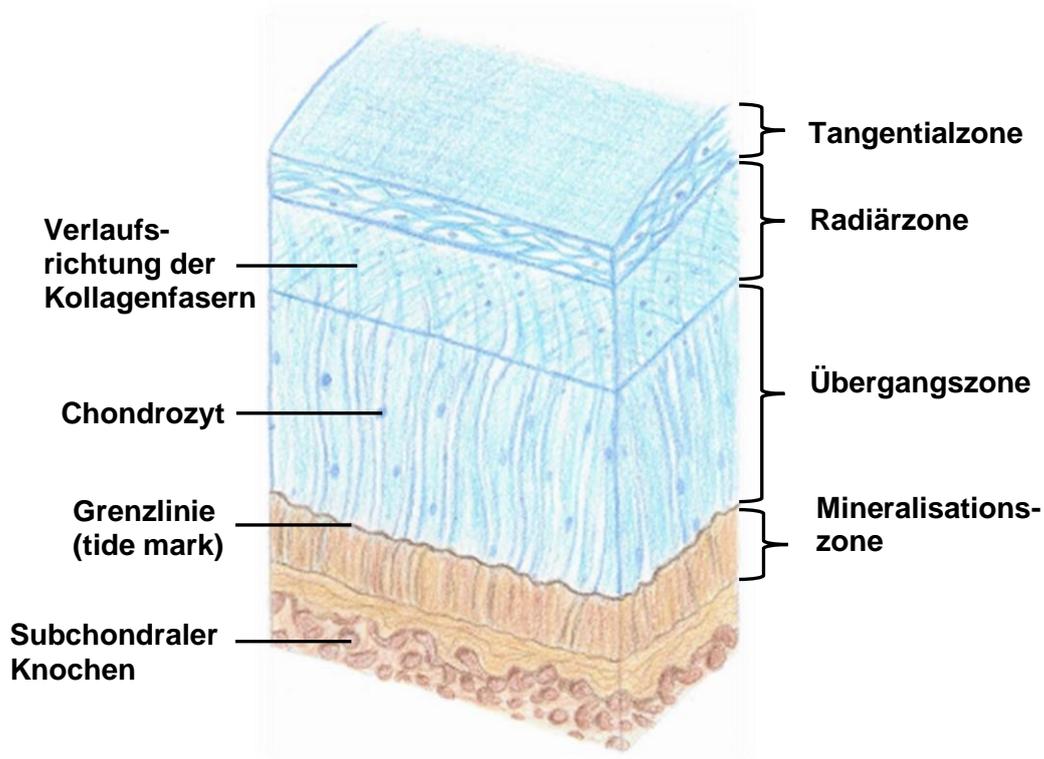


Abbildung 4: Schematische Zonengliederung des Gelenkknorpels.

Einleitung

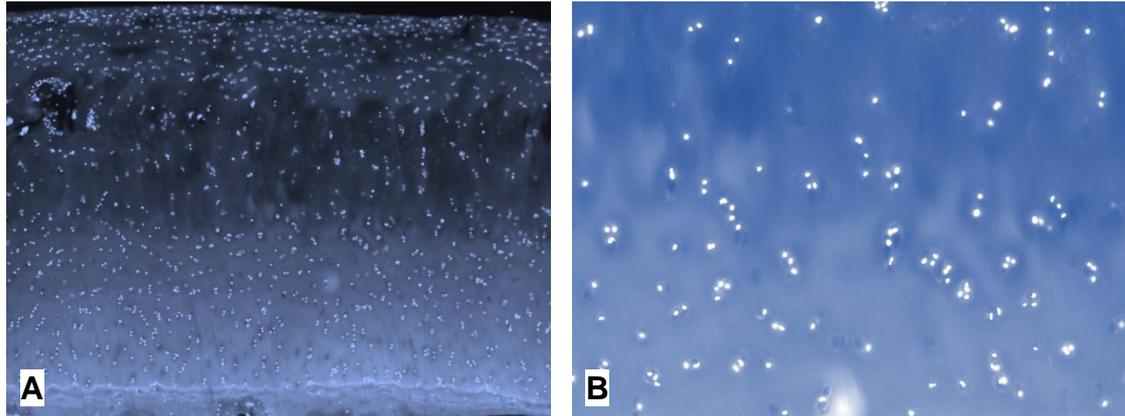


Abbildung 5: Histologische Aufnahmen von hyalinem Gelenkknorpel des Knies. A: In 100-facher Vergrößerung mit Matrix des Knorpels, Tide mark und subchondralem Knochen. B: Ausschnitt aus A bei 400-facher Vergrößerung.

Hyaliner Knorpel hat keine eigene Blutversorgung. Er wird von einer bindegewebigen Schicht, dem Perichondrium umgeben. Das Perichondrium wird durchblutet und kann den hyalinen Knorpel versorgen. Gelenkknorpel besteht zwar aus hyalinem Knorpel, besitzt aber kein Perichondrium. Die Versorgung des Gelenkknorpels kann mangels eines Perichondriums lediglich durch Diffusion der Gelenkflüssigkeit, der Synovia, gewährleistet werden. Aufgrund der hohen Wasserbindungskapazität des Aggrekan-Hyaluronat-Komplexes wird die Diffusion der Synovia durch das Gewebe ermöglicht. Das Perichondrium enthält außerdem undifferenzierte mesenchymale Zellen mit der Möglichkeit zur Differenzierung zu Chondroblasten. Hyaliner Knorpel kann also bedingt, durch das Perichondrium begrenzt, regeneriert werden [63]. Mit zunehmendem Alter verschlechtert sich der Ernährungszustand des Gelenkknorpels durch Veränderungen der Synovialkapillaren und der Synovialflüssigkeit [63]. Außerdem nimmt der Proteoglykangehalt im Alter fortschreitend ab und hat eine reduzierte Ladungsdichte [6], was eine Reduktion des Flüssigkeitsgehaltes der Knorpelmatrix zur Folge hat [78, 85]. Die gesamte Zusammensetzung der Knorpelmatrix verändert sich, die Aktivität der Chondrozyten nimmt ab und sie reagieren weniger auf Wachstumsfaktoren [12]. Die Veränderungen resultieren in verminderter Elastizität des Gelenkknorpels [44].

1.2 Pathologien des Gelenkknorpels

1.2.1 Chondropathie

Chondropathie ist der Überbegriff für eine pathologische Veränderung des Gelenkknorpels ohne Arthrosezeichen [95]. Es handelt sich um einen Defekt, an dessen Lokalisation der Gelenkknorpel dünner als physiologisch ist. Normalerweise beträgt die Dicke des Gelenkknorpels an den Femurkondylen 2-4 mm [2]. Knorpelschäden lassen sich in zwei Kategorien einteilen, die chondralen Schäden und die osteochondralen Schäden. Chondrale Schäden sind auf den Knorpel begrenzt, während osteochondrale Schäden auf den darunter liegenden subchondralen Knochen ausgebreitet sind. [Bei chondralen Schäden lässt sich zwischen oberflächlichen und vollschichtigen Läsionen unterscheiden (Abbildung 6). Im Gegensatz zur Arthrose kann man bei der Chondropathie keine bevorzugte Altersgruppe festlegen, Knorpelschäden können in jedem Alter auftreten. Die größte Gruppe wird jedoch von Personen gebildet, die über 40 Jahre alt sind [16].

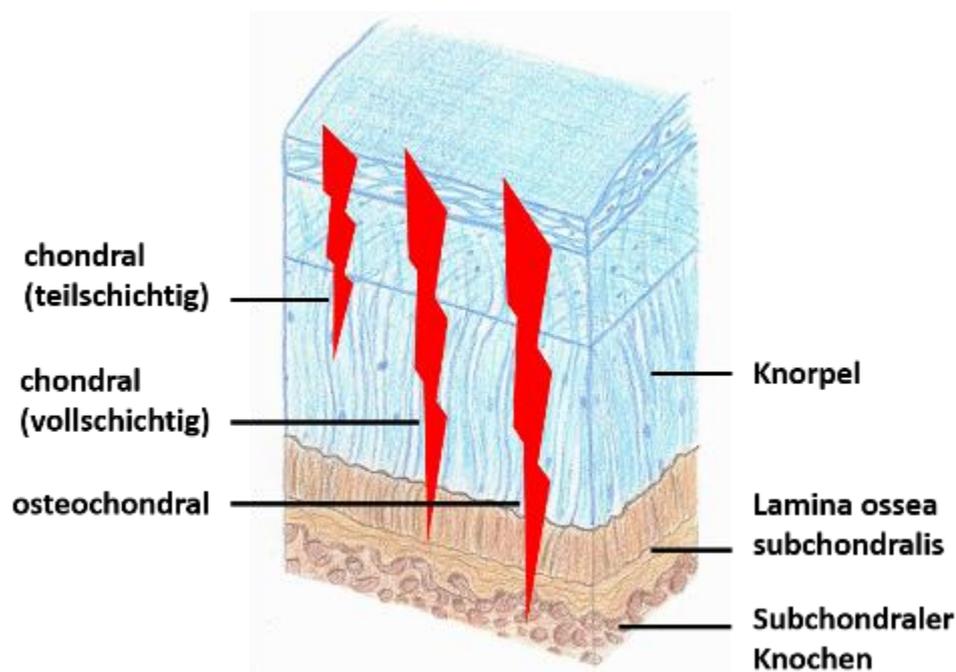


Abbildung 6: Terminologie der Knorpelläsionen.

Die Ursachen von Chondropathie sind unterschiedlicher Art. Hauptsächlich unterscheidet man zwischen Läsionen traumatischer Genese, die meist fokal begrenzt sind, und degenerativen Schäden, die oft disseminiert ausgeprägt sind.

Einleitung

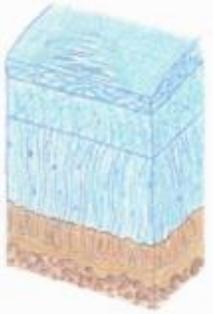
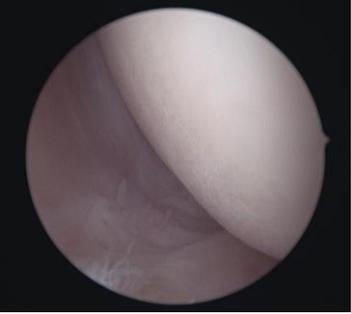
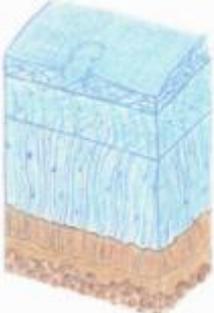
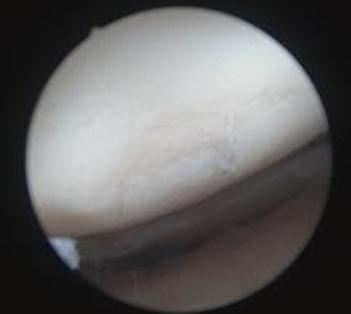
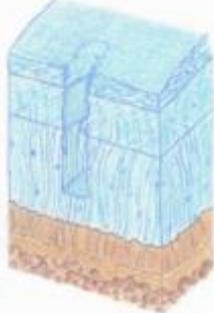
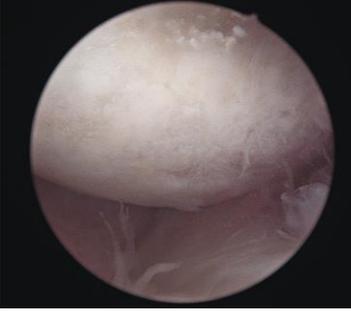
„Scher-, Rotations- oder Tangentialkräfte“ [95] können zu traumatischen Knorpelverletzungen am Knie führen. Bei starken Traumata kann außerdem der subchondrale Knochen mit betroffen sein. Bei der traumatisch bedingten Chondropathie weisen die Schäden meist scharfe Ränder auf [95]. Chondropathien bei Personen, die jünger als 40 sind, sind zumeist traumatische Läsionen [16].

Frühe degenerative Schäden, welche auf den hyalinen Gelenkknorpel begrenzt sind, werden ebenfalls als Chondropathie bezeichnet. Ein Beispiel dafür ist die Chondropathie an der Patella, auch als Chondromalacia patellae bekannt [66, 95]. Abnutzungserscheinungen werden durch bestimmte Risikofaktoren gefördert. Eine anatomische Fehlstellung, wie das Genu varum und valgum, oder eine chronische Gelenkinstabilität können Prädiktoren für die Degeneration des Gelenkknorpels darstellen [31].

Weitere Ursachen für eine Chondromalazie sind Osteochondrosis dissecans, chronisch entzündliche Gelenkerkrankungen sowie Hämophilie. [81, 82].

Das Ausmaß eines Knorpelschadens lässt sich mit dem „*Hyaline Cartilage Lesion Classification System*“, dem internationalen Standard von der International Cartilage Repair Society (ICRS) bestimmen. Es handelt sich um eine Erweiterung der Outerbridge-Klassifikation, welche vor Einführung des ICRS als Standard galt. Zur Diagnostik von Gelenkknorpelschäden wird die Outerbridge-Klassifikation jedoch immer noch häufig angewendet, obwohl sie laut Arthroskopiegesellschaft als überholt gilt. Von den Arthroskopiegesellschaften wird aufgrund der genaueren Differenzierung die Klassifikation nach ICRS empfohlen [10] „*Die Einteilung basiert auf der arthroskopischen Einschätzung der bereits debridierten Läsion.*“ [31]. Dabei wird die Tiefe, die Ausdehnung des Schadens und die Lokalisation beurteilt (Tabelle 1) [33]. Die Klassifikation nach Outerbridge setzt hingegen die Progression des Knorpelschadens voraus und ist demnach primär für degenerative Knorpelschäden anwendbar. Ursprünglich wurde die Outerbridge-Klassifikation für den Verlauf der Chondromalacia Patellae erstellt [66, 101]. Es wird vor allem die Tiefe des Schadens beurteilt.

Einleitung

Outer-bridge	ICRS	Beschreibung	Histologisch	Arthroskopisch
I	I a	Intakte Oberfläche, Fibrillationen und / oder leichte Erweichung		
	I b	Zusätzlich oberflächliche Risse / Fissuren		
II	II	Läsionstiefe < 50 % der Knorpeldicke (abnormaler Knorpel)		
III	III a	> 50 % Tiefe der Knorpeldicke, nicht bis zur kalzifizierenden Schicht (schwer abnormaler Knorpel)		

Einleitung

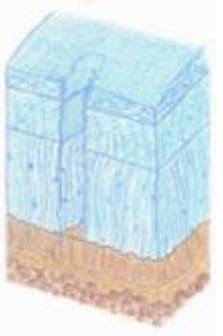
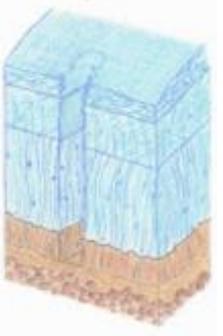
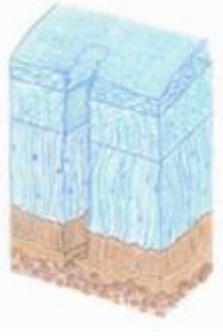
	III b	> 50 % Tiefe der Knorpeldicke, bis zur kalzifizierenden Schicht		
	III c	> 50 % Tiefe der Knorpeldicke, bis zur subchondralen Platte		
	III d	> 50 % Tiefe der Knorpeldicke, mit Blasenbildung		
IV	IV	Vollständige Knorpelläsion mit Durchbruch der subchondralen Platte		

Tabelle 1: Klassifikation von Knorpelschäden [33] (histologische Abbildungen modifiziert nach [33]).

Gelenkknorpel ist nicht durchblutet und hat nur begrenzte Möglichkeiten zur Selbstreparatur. Gelenkknorpel ist nicht nur avaskulär sondern auch aneural. Das Fehlen von schmerzleitenden Neuronen ist für die Abwesenheit von

Einleitung

Schmerzempfinden im Gelenkknorpel verantwortlich. Der subchondrale Knochen ist jedoch gut innerviert. Bei osteochondralen Schäden wie bei Grad IV nach ICRS, kommt es häufig zu erheblichen Knieschmerzen. Chondropathie am Kniegelenk kann eine akute Synovialitis zur Folge haben. Durch die Entzündung kommt es zur reaktiven Hyperämie mit Ödembildung und Gelenkerguss.

Diagnostiziert wird die Chondropathie neben Anamnese und körperlicher Untersuchung mittels Röntgen, MRT oder in der diagnostischen Arthroscopie. Im Röntgen können keine chondralen Schäden identifiziert werden. Lediglich knöcherne Läsionen in spätem Stadium sind beurteilbar. Einen degenerativen Knorpelschaden erkennt man im Röntgen anhand der Arthrosezeichen (1.2.2). Das Röntgen stellt keine zuverlässige Option zur Beurteilung und Klassifikation der Chondropathie dar [44].

In der MRT sind vor allem protonendichte, T2-gewichtete, Fast-Spin-Echo (FSE), 3D-spoiled-Gradienten-Echo (SPGR)- und Fast-low-angle-shot (FLASH)-Sequenzen sinnvoll. Besonders bei fettsupprimierten Aufnahmen lassen sich Knorpelschäden gut darstellen. In der MRT lassen sich die Unterschiede zwischen Grad 0, Ia, Ib und II nach ICRS nicht sicher darstellen, während die Unterscheidung zwischen Grad II und III nach ICRS gut möglich ist. Die Grade IIIa – IIIc nach ICRS sind nicht zu differenzieren. Besser als in der Arthroscopie kann man in der MRT subchondrale Knochenläsionen sehen, welche auf einen Knorpelschaden Grad III oder IV nach ICRS hinweisen. In der MRT wird die flächige Ausbreitung des Knorpelschadens oft unterschätzt. Eine bessere Aussagekraft kann durch eine MR-Arthrografie erzielt werden [52, 98]. In der MRT können Knorpelschäden in frühen Stadien I und II nach ICRS sowie die Tiefe und Ausdehnung bei fortgeschrittenen Läsionen Grad III nach ICRS nicht verlässlich erkannt werden [98].

In der diagnostischen Arthroscopie (1.3) werden Knorpelschäden ebenfalls klassifiziert. Durch den arthroskopischen Tastbefund können Tiefe und Ausdehnung einer Läsion bestimmt werden [44]. In der Arthroscopie werden jedoch frühe Stadien eines Knorpelschadens teils unterschätzt und schwere Schäden überschätzt [11]. Der subchondrale Knochen ist in der Arthroscopie nicht beurteilbar, sofern er nicht freiliegt. Die Klassifikation in der diagnostischen

Einleitung

Arthroskopie kann nur verlässlich erfolgen, wenn der Defekt zuvor debridiert wurde [98]. Bei der diagnostischen Arthroskopie handelt es sich im Übrigen um einen invasiven chirurgischen Eingriff, weshalb stets die Indikation abgewogen werden muss. Dennoch stellt die Arthroskopie zurzeit den Goldstandard dar, um Knorpelschäden zu beurteilen und nach ICRS- oder Outerbridge-Klassifikation einzuteilen [44].

Je akuter Gelenkknorpel geschädigt wird, desto schwerwiegender sind die Folgen. Durch den Defekt wird eine Kettenreaktion ausgelöst. Beim Trauma werden Enzyme freigesetzt, welche strukturelle Veränderungen der Knorpelmatrix und Knorpeldestruktion zur Folge haben und der Gelenkknorpelschaden wird progredient. Durch lysosomale Enzyme werden zunächst Glykosaminoglykane von den Kernproteinen der Proteoglykanen abgespalten. Durch Proteasen werden die Kern- und Kettenproteine sowie durch Hyaluronidasen die Hyaluronketten zersetzt. Kollagenfasern werden durch Kollagenasen zerstört, welche zu den Matrixmetalloproteinasen gehören [63]. Des Weiteren führt ein Knorpelschaden zum Zelltod der Chondrozyten [99], Gewebeerweichung, „*Verlust der Interkonnektivität des Netzwerks*“ [94] und Rissen und Fissuren [15, 29]. Durch die enzymatische Knorpeldestruktion wird das Kollagengerüst abgebaut und damit die Knorpelarchitektur zerstört, was Einbußen der Knorpelstabilität zur Folge hat. Des Weiteren führen die Veränderungen der Matrix zu verminderter Wasserbindungskapazität, wodurch die Gelenkoberfläche weniger druckelastisch und anfälliger für weitere Schäden ist. Bei der Zerstörung von Knorpelgewebe werden vasoaktive Substanzen und Kinine freigesetzt. Die Enzyme induzieren eine Synovialitis. Wie bereits erwähnt, führt eine Synovialitis wiederum zur Knorpeldestruktion [63]. Es kommt langfristig zum Mangel an Gelenkknorpel, einer Chondropenie. Der Defekt kann schließlich zu beschleunigter Arthrose führen [44].

Wenn der Defekt bis zum Knochen reicht, wird durch die dort vorhandene Blutversorgung eine Defektheilung in Gang gesetzt. Es kommt zu Narbenbildung und Fibrosierung. Es entsteht Faserknorpel anstelle des hyalinen Knorpels. Faserknorpel ist dem hyalinen Knorpel gegenüber im Bereich von Gelenken

Einleitung

funktionell minderwertig. Die Struktur des Faserknorpels ist der enormen mechanischen Belastung, die auf den Gelenkknorpel wirkt, nicht gewachsen [31].

Ob eine Knorpeltherapie durchgeführt wird, ist individuell und patientenabhängig einzuschätzen. Hauptindikator für eine Knorpelzelltherapie ist der individuelle schmerzbedingte Leidensdruck des Patienten. Natürlich müssen auch Voroperationen und -erkrankungen berücksichtigt werden. Kontraindikationen bei Knorpelreparaturverfahren sind unter anderem eine bereits vorhandene Arthrose, die rheumatoide Arthritis, weitgehender Meniskusverlust [106], ein hoher Body Mass Index (BMI), das Vorhandensein von „*kissing lesions*“ [72, 106] und die fehlende Compliance des Patienten. Gelenkknorpelreparaturverfahren sollen die Lebensqualität des Patienten fördern und Beschwerden reduzieren. Die Funktion des Knies im Alltag soll verbessert und die Progression des vorhandenen Knorpeldefektes verlangsamt werden. Außerdem soll die Therapie den möglichen Gelenkersatz durch eine Prothese möglichst verzögern oder gar verhindern [98]. Die Therapiewahl hängt immer von der Defektgröße und -tiefe ab [7].

Ein konservativer Therapieansatz ist die Injektion von Glukosaminen, Chondroitinsulfat oder Hyaluronsäure. Dadurch soll die Gleitfähigkeit im Gelenk verbessert werden. Die Injektionstherapie wirkt chondroprotektiv und soll die Regeneration des Knorpels verstärken [95]. Die Wirksamkeit der Therapie ist jedoch umstritten [28]. Bei erst- und zweit-gradigen Läsionen nach ICRS kann konservativ therapiert werden (Tabelle 2).

Sollte dennoch bei Läsionen Grad II nach ICRS aufgrund persistierender Beschwerden eine operative Therapie indiziert sein, ist zunächst ein arthroskopisches Debridement der Läsion indiziert (Tabelle 2). Hierbei ist darauf zu achten, dass lediglich am Übergang zum gesunden Knorpel ein stabiler Rand geschaffen und die Vergrößerung der Läsion dadurch verlangsamt wird. Es muss darauf geachtet werden, die Defekttiefe nicht zu vergrößern. Das Debridement dient oft der Vorbereitung auf die weitere Behandlung.

Einleitung

Die chirurgischen Knorpeltherapien lassen sich in zellgebundene und zellfreie Verfahren sowie osteochondrale Verfahren einteilen. Zu zellfreien Verfahren gehört die autologe matrixinduzierte Chondrogenese (AMIC). Zu den zellgebundenen Therapien zählen die Mikrofrakturierung und die autologe Chondrozytentransplantation (ACT). Osteochondrale Verfahren stellen die autologe osteochondrale Transplantation (OATS) und der Kondylentransfer (Mega-OATS), sowie die Spongiosaplastik in Verbindung mit der matrixassoziierten autologen Chondrozytentransplantation und die osteochondrale Allograft-Transplantation dar [7].

Bei der autologen matrixinduzierten Chondrogenese (AMIC) handelt es sich um eine Kombination aus Mikrofrakturierung und der Implantation einer Kollagen-Typ-I/III-Membran. Bei dem Verfahren werden Stammzellen durch die Membran zur Differenzierung zu Chondrozyten angeregt. Das Verfahren wird für Schäden $> 2 \text{ cm}^2$ angewendet. Das AMIC-Verfahren kommt auch bei osteochondralen Schäden in Frage. Es können ebenfalls eine Chitosan-Biomatrix und eine Matrix aus Kollagen Typ I als zellfreie Verfahren angewendet werden [4, 7].

Bei der Mikrofrakturierung, retro- und anterograder Anbohrung oder einer Abrasionsarthroplastik entstehen Mikroblutungen. Durch den zugefügten kleinen Schaden kommt es zur Akquisition mesenchymaler Stammzellen und zur Bildung von Bindegewebe und Faserknorpel. Die Technik dient der Verbesserung der Symptome über einen limitierten Zeitraum, bis der Faserknorpel abgenutzt ist. Bei kleinen Knorpelschäden von $1 - 3 \text{ cm}^2$ wird häufig die Mikrofrakturierung angewandt. Sie eignet sich bei Schäden Grad III nach ICRS mit scharf begrenztem Rand (Tabelle 2). Die antero- und retrograde Anbohrung wird vor allem bei osteochondralen Läsionen (OCL) bei Osteochondrosis dissecans angewandt [7, 98].

Eine weitere Option stellt die matrixassoziierte autologe Chondrozytentransplantation (MACT) dar. Bei der matrixgekoppelten Chondrozytentransplantation werden die Knorpelzellen auf „*resorbierbaren dreidimensionalen Trägermaterialien*“ [98] in den Defekt implantiert. Als mit Zellen besetztes Transplantat dient eine 3-D-Kollagenmatrix, eine Suspension (Hydrogel) oder eine Chondrosphere [7]. Voraussetzung zur ACT ist, dass der

Einleitung

subchondrale Knochen intakt ist, da bei dieser Methode lediglich Knorpel transplantiert wird. Die Therapieoption ist oft die Therapie der Wahl bei jüngeren Patienten mit großen, isolierten Defekten von 3 – 14 cm² [7]. Sie eignet sich bei Defekten Grad III b – III d (Tabelle 2) [98]. Für osteochondrale Defekte stellt die matrixgestützte Chondrozytentransplantation (MACT) in Kombination mit einer Knochenaugmentation (Sandwich-MACT-Technik) eine Therapieoption dar. Dabei wird zunächst der knöcherne Defekt mit einer Spongiosaplastik, oder bei größeren Defekten mit einem Beckenkammtransplantat, aufgefüllt und per MACT bedeckt [56, 62, 107].

Die autologe Knorpel-Knochen-Transplantation (OATS) wird bei osteochondralen Läsionen angewendet. Aus einer benachbarten Region im selben Gelenk, welche wenig oder gar nicht belastet wird, wird ein Knorpel-Knochen-Zylinder entnommen und in die Defektregion implantiert. Hierfür eignet sich vor allem der Bereich der proximalen lateralen und medialen Trochlea [25]. Der Knorpel-Knochen-Zylinder wird mit der „*press fit*“-Verankerung in den Defekt eingebracht. Werden mehrere Zylinder verwendet, handelt es sich um eine Mosaikplastik. Bei der OATS erfolgt die Defektdeckung mit hyalinem Gelenkknorpel. Die Methode ist eine gute Option bei der Osteochondrosis dissecans und auch bei Schäden Grad III – IV nach ICRS, welche bereits auf den Knochen übergehen (Tabelle 2). Sie wird bei Läsionen bis zu 2 – 3 cm² verwendet. Bei größeren Schäden bis zu 9 cm² wird die Mega-OATS-Technik angewandt, wobei in maximaler Flexion die posteriore mediale Femurkondyle zur Transplantation entnommen wird [7, 98, 107].

Ein weiteres Verfahren ist die osteochondrale Allograft-Transplantation. Dabei wird aus einem frischen Leichenknie Knorpel und Knochen entnommen und in den Schaden implantiert.

Besteht eine anatomische Fehlstellung oder eine Bandinstabilität als Ursache der Chondropathie, sollte dies separat vorher oder zusammen mit dem Reparaturverfahren behoben werden [95].

Klassifikation von ICRS/ Outerbridge	konservativ	Debride- ment	Mikrofraktu- rierung	(Mega-) OATS	ACT
I	+	-	-	-	-
II	+	(+)	-	-	-
III	-	(+)	+++	++	+++
IV	-	(+)	-	+++	++

Tabelle 2: Zusammenfassung der empfohlenen Therapie entsprechend der Klassifikation von Knorpelschäden [98].

Bedeutung: – nicht empfohlen; (+) bedingt empfohlen; + mögliche Therapie; ++ empfohlen; +++ Therapie der Wahl.

Mit dem Übergang von Grad II zu Grad III nach ICRS wechselt der Therapieansatz von konservativ zu operativ (Tabelle 2). Es wird entweder zunächst debridiert oder direkt eine weiterführende operative Maßnahme eingeleitet. Anhand des Therapieschemas erkennt man die bedeutende Rolle, die der Klassifikation des Knorpelschadens in der Diagnostik zukommt. Die Möglichkeiten zur Darstellung und Beurteilung von Knorpelschäden sind noch ausbaufähig und neue Methoden sind notwendig, um Schäden optimal einteilen zu können [58, 70, 74, 76]. Die Entscheidung des Arztes bezüglich der Klassifikation hat diesbezüglich erhebliche Konsequenzen für den Patienten [44].

1.2.2 Gonarthrose

Bei Arthrose handelt es sich um eine chronisch degenerativ progressive Destruktion des Gelenkknorpels, welche durch Abnutzung und Verschleiß entsteht. Unbehandelte Chondropathie kann durch degenerative Prozesse zur Arthrose führen. Bei Gonarthrose handelt es sich um eine Läsion des Kniegelenks unter Beteiligung des Kapsel-Bandapparates und der Muskulatur, während der Defekt der Chondropathie meist lokal begrenzt auftritt.

Betroffen von der Erkrankung sind vor allem ältere Personen über 50 Jahre, die Prävalenz nimmt mit dem Alter zu [13, 27]. Wenn die Erkrankung bei jüngeren Menschen auftritt, handelt es sich meist um die sekundäre Form.

Es lässt sich zwischen der primären idiopathischen Gonarthrose und der sekundären unterscheiden [65]. Es sind prädisponierende Faktoren bekannt wie

Einleitung

ein hoher BMI, das weibliche Geschlecht und das Alter [13, 22, 23, 27, 68]. Je stärker das Kniegelenk im Alltag beansprucht wird, desto wahrscheinlicher kommt es zu Abnutzungserscheinungen [9, 65]. Die Ursache der sekundären Gonarthrose liegt in einer Vorerkrankung, welche zur Überbelastung führt. Dabei kann es sich um Kniebinnenschäden handeln wie Kreuzband- oder Meniskusläsionen [104]. Klassische Ursachen für die sekundäre Gonarthrose sind das Genu varum und Genu valgum [104]. Weitere mögliche Ursachen für die sekundäre Gonarthrose sind Entzündungen oder metabolische Störungen wie Diabetes mellitus [68, 100].

Die Gonarthrose wird im Gegensatz zur Chondropathie nicht nach ICRS-Klassifikation eingeteilt. Bei Arthrose ist die Klassifikation anhand von radiologischen Kriterien nach Kellgren und Lawrence geläufig (Tabelle 3) [40].

Stadium	Radiologische Veränderungen
0	Normaler Gelenkspalt
1	Geringe subchondrale Sklerosierung, keine Osteophyten, keine Gelenkspaltverschmälerung
2	Unregelmäßige Gelenkfläche mit subchondraler Sklerosierung, beginnende Osteophytenbildung, geringe Gelenkspaltverschmälerung
3	Deutliche Unregelmäßigkeit der Gelenkfläche, ausgeprägte Osteophytenbildung, Gelenkspaltverschmälerung
4	Deformierung bzw. Nekrose der Gelenkflächen, ausgeprägte Osteophytenbildung, ausgeprägte Gelenkspaltverschmälerung bis zur vollständigen Destruktion

Tabelle 3: Klassifikation der Gonarthrose nach Kellgren und Lawrence [40].

Hauptsymptome der Gonarthrose sind Knieschmerzen und zunehmende Bewegungseinschränkung. Durch vermehrte Belastung des betroffenen Knies kann es zu entzündlichen Prozessen mit Schwellung und Kniegelenkserguss kommen. Bei aktivierter Arthrose sind typische Entzündungszeichen vorhanden. Typische Symptome sind ein hinkendes Gangbild, Druckschmerzen über den Epikondylen, dem Gelenkspalt oder den Patellafacetten [92].

Die Diagnostik erfolgt üblicherweise durch Anamnese, körperliche Untersuchung und die radiologische Bildgebung anhand einer Röntgenaufnahme in zwei Ebenen. Diese erfolgt als Funktionsaufnahme im Stehen. Ergänzend kann auch

Einleitung

eine MRT- oder CT-Aufnahme gemacht werden [92]. Die Arthrosezeichen im Röntgen sind Gelenkspaltverschmälerung, Osteophytenbildung, Geröllzysten und subchondrale Sklerosierung (Abbildung 7) [40]. Wichtig für die Therapie ist, dass die Anzeichen im Röntgenbild nicht mit der Klinik übereinstimmen müssen [48, 67]. Dementsprechend muss die Therapie individuell auf die Schmerzen des Patienten abgestimmt werden [92].



Abbildung 7: Röntgenbefund bei Varusgonarthrose.

Degenerative Veränderungen mit Gelenkspaltverschmälerung, subchondraler Sklerosierung und Osteophytenbildung. A: Ansicht linkes Knie von ventral. B: mediale Ansicht auf das Knie (Mit freundlicher Genehmigung der orthopädischen Universitätsklinik Tübingen).

Bei Arthrose handelt es sich um eine primär mechanische Schädigung mit strukturellem Abbau des Gelenkknorpels, welche langsam fortschreitet. Dadurch passt sich das Gewebe an und die Funktion des Gelenks kann lange aufrechterhalten werden [63]. Es entstehen zunächst Knorpelerweichungen, welche in Einrisse und Fissuren übergehen, die schließlich bis zum Knochen reichen können. Bei Verlust der gesamten Knorpelschicht spricht man von einer Knochenglatze. In der perizellulären Matrix entsteht initial ein Verlust an

Einleitung

Proteoglykanen, der zu Aufspaltungen und Fissuren im Gewebe führt [44]. Außerdem wird das Kollagennetzwerk gelockert [57] und der Gehalt an Kollagen II nimmt ab [89]. Gleichzeitig wird die Synthese von Proteoglykanen, Kollagen [55] und die unkontrollierte Produktion von Matrixmetalloproteasen [17] gesteigert. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Kollagenspaltung im Defekt und entfernt der Läsion verbunden ist [89], was die Progredienz der Degeneration fördert. Wie auch bei der Chondropathie werden vermehrt GAGs abgespalten. Dadurch werden die Wasserbindungskapazität und die Druckelastizität des Gewebes verringert. Auf zellulärer Ebene lässt sich ein Regenerationsphänomen erkennen. Bei Chondrozyten kommt es zur Hypertrophie und in späten Stadien schließlich zur Clusterbildung [17]. Der subchondrale Knochen induziert vermehrt Sklerosierung und Verkalkung des Tidemark-Bereiches des Knorpels [44].

Die medikamentöse Schmerztherapie erfolgt entsprechend den subjektiven Beschwerden des Patienten nach WHO-Stufenschema. Eine operative Therapie sollte erst eingeleitet werden, wenn alle konservativen Maßnahmen ausgeschöpft wurden. Ziele der jeweiligen Therapie sind eine verbesserte Funktion und Beweglichkeit des betroffenen Gelenks, die Reduktion bis Eradikation der Schmerzen sowie die damit verbundene verbesserte Lebensqualität. Es können bereits präventive Maßnahmen durch die Vermeidung von Risikofaktoren getroffen werden [92].

1.3 Arthroskopie

Eine Arthroskopie ist eine minimalinvasive diagnostische oder therapeutische Operationsmethode in der Orthopädie. Über eine Inzision wird ein Endoskop eingeführt. Die erste Arthroskopie wurde im Jahre 1912 von Severin Nordentoft auf dem Deutschen Chirurgen-Kongress in Berlin vorgestellt, er beschrieb die Kniearthroskopie mit einem Trokar-Endoskop [34, 41, 64]. Eugen Bircher wandte ab 1921 die Arthroskopie in der Diagnostik von Meniskusschäden an [42]. In den letzten Jahrzehnten wurde die Arthroskopie durch den technischen Fortschritt weiterentwickelt. Durch die Kombination des Stablinsenssystems nach H. H. Hopkins mit einer Lichtübertragung via Fiberglasfasern durch die Firma

Einleitung

Karl Storz in den 70er Jahren wurde das erste leistungsfähige Arthroskop hergestellt [44]. Die Arthroskopie findet in vielen Bereichen der Orthopädie Anwendung. Vor allem die großen Gelenke, wie das Knie, werden häufig arthroskopiert [31]. Durch den technischen Fortschritt gibt es immer kleinere Arthroscopie, was die Arthroskopie auch an kleineren Gelenken, wie der Hand, ermöglicht [80].

1.4 Optische Darstellung und Fluoreszenz des Knorpels

1.4.1 Optische Darstellung

Gelenkknorpel sieht in frischem Zustand bläulich-weiß, milchig und durchscheinend aus. In dünnen Scheiben wirkt er glasig, klar und transparent [83]. In der Arthroskopie hat unversehrter Gelenkknorpel eine homogene, glatte Oberfläche, die das reibungsarme Gleiten der Gelenkoberflächen ermöglicht.

1.4.2 Fluoreszenzverhalten des Knorpels

Fluoreszenz bezeichnet die spontane Emission von Licht durch einen Stoff bei Anregung durch Licht. Bei Anregung durch eine Lichtquelle nimmt ein Molekül Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung auf. Genauer nimmt das Molekül bei der Exzitation Photonen auf. Durch die Aufnahme der Photonen werden die Elektronen des Moleküls in einen energetisch höheren Zustand überführt. Die aufgenommene Energie wird innerhalb weniger Nanosekunden wieder abgegeben. Bei der spontanen Energieabgabe fallen die Elektronen des Moleküls wieder in einen energieärmeren Zustand zurück. Die abgegebene Energie wird bei der Emission in Form von sichtbarem Licht freigesetzt. Während der Emission bleibt ein Teil der Anregungsenergie in Form von thermischer und Schwingungsenergie im Molekül zurück. Bei der Emission wird weniger Energie abgegeben als aufgenommen wurde, folglich ist das abgegebene Licht energetisch ärmer und langwelliger. Die Wellenlängendifferenz zwischen Anregungsspektrum und Emissionsspektrum wird Stokes'sche Verschiebung genannt (Abbildung 8) [61, 81, 91].

Einleitung

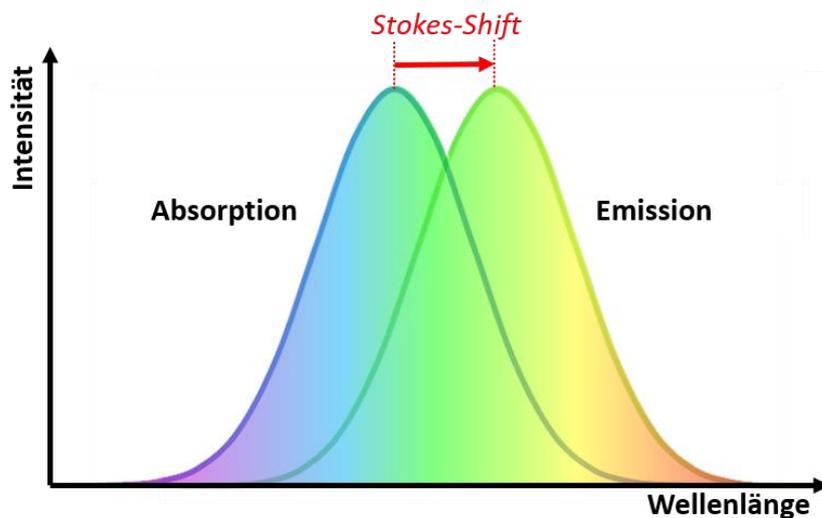


Abbildung 8: Darstellung des Stokes-Shift.

Stoffe, die fluoreszieren, heißen Fluorophore. Fluorophore, mit denen Präparate angefärbt werden, heißen Fluorochrome. Eine besondere Form der Fluoreszenz ist die Autofluoreszenz, oder auch intrinsische Fluoreszenz genannt. Im tierischen Organismus autofluoreszieren Flavine in Mitochondrien und Lipofuscin in Lysosomen [46]. Die Autofluoreszenz der Interzellularsubstanz ist stärker als die der Zellorganellen: Die Coenzyme NADH [26, 59] und FAD [59] sowie die Faserproteine Elastin [8] und Kollagen [24] zeigen intrinsische Fluoreszenz.

Muss ein Präparat erst durch einen Fluoreszenzfarbstoff angefärbt werden, wird künstlich Sekundärfluoreszenz erzeugt. Dadurch werden gezielt einzelne Zellbestandteile angefärbt. Verschiedene fluoreszenzmarkierte Liganden, Antikörper oder Proteine binden bei diesem Vorgehen an Zellbestandteile. Im biomedizinischen Bereich wird außerdem die Immunfluoreszenz häufig angewandt [46, 81].

Im Gelenkknorpel lässt sich die Autofluoreszenz von Kollagen II betrachten. Kollagen II hat ein Absorptionsmaximum von 335 nm und ein Emissionsmaximum von 390 – 430 nm [54, 82]. Die Autofluoreszenz von Kollagen II beruht auf Quervernetzungen [24]. Es gibt zwei Arten von Quervernetzungen zwischen Kollagenfasern, Hydroxylylpyridinolin (HP) und Lysylpyridinolin (LP) [20, 24, 75]. Die Quervernetzungen sind wichtig für die mechanische Stabilität [53]. Durch die Autofluoreszenz des Kollagen II im

Einleitung

Gelenkknorpel lässt sich das Gewebe unter ultraviolettem Licht (UV-Licht) darstellen. Gesunder Gelenkknorpel emittiert unter UV-Licht in bläulicher Farbe. Bei Vorliegen eines Gelenkknorpelschadens verändert sich das Fluoreszenzverhalten der betroffenen Region. Wird bei einem Knorpeldefekt das kollagene Netzwerk geschädigt, verliert der Knorpel seine autofluoreszierende Eigenschaft. Die betroffene Region kann bei Anregung unter UV-Licht kein Licht mehr emittieren und ist somit gut von unversehrtem Gewebe kontrastiert und abgrenzbar. Bei gesundem Knorpel liegen viele Schichten an Kollagenfasern übereinander (1.1.2), die gemeinsam die Stärke des emittierten Lichtes erzeugen. Wird nun die oberste Schicht geschädigt, können nur noch die darunter liegenden intakten Schichten blau fluoreszieren. Je weniger Kollagenfasern intakt sind, desto schwächer fällt die Fluoreszenz des Gewebes aus [50]. Folglich wird die intrinsische Fluoreszenz umso schwächer, je tiefer und fortgeschrittener eine Läsion ist [50].

1.4.3 Bisherige Anwendung der Fluoreszenz in der Medizin

In der Endoskopie wird das Fluorochrom Indocyanidgrün (ICG) zur teils intraoperativen Darstellung von Gewebe angewandt. Unter Nahinfrarotlicht wird ICG zur Perfusionskontrolle, Anastomosenkontrolle, Gallengangsdarstellung und zur Darstellung von Lymphknoten verwendet [39].

Der „ALA“-Filter der Storz-Arthroskope wird bisher in verschiedenen medizinischen Bereichen eingesetzt. In der Urologie können Harnblasentumore in der photodynamischen Therapie (PDT) unter Anwendung von Fluoreszenz mit dem Farbstoff Hypericin früh diagnostiziert werden [90]. Außerdem wird die PDT bei der Therapie von Glioblastomen eingesetzt [37, 102]. Der AF-Filter wird in der Tumorfürhdiagnostik der Bronchien angewendet. Bei Anregung von gesundem Gewebe mit dem blauen Licht des „AF“-Filters kommt es zur intrinsischen Fluoreszenz. Das Gewebe leuchtet grün (Abbildung 12 D). Pathologisches Gewebe fluoresziert nicht [39].

Auch in der orthopädischen Arthroskopie wird bei der Diagnostik von rheumatischen Arthritiden bereits die Nahinfrarot-(NIR)/ICG-Technologie von Storz eingesetzt [39, 103]. Bei der Nahinfrarot-Technik können die Eigenschaften

Einleitung

sowie die Zusammensetzung von Knorpel und subchondralem Knochen schnell in vivo beurteilt werden [77]. Die Technologie dient der Darstellung der Entzündungsaktivität und zur Differenzialdiagnostik [19, 105]. Die inflammatorische Aktivität kann auf demselben Weg auch bei Arthrose dargestellt werden [103]. Auch Knorpelschäden wurden bereits mittels Nahinfrarotspektroskopie untersucht [77]. Sehr effektiv ist hierbei der Effekt, dass defekter Knorpel umso mehr des Lichts absorbiert, je stärker er beschädigt ist [88]. Außerdem gibt es erste Untersuchungen im Bereich der Messung der „*autofluorescence lifetime*“ (Autofluoreszenz-Lebensdauer) zur Diagnostik von Knorpelschäden im Rahmen der Arthrose. Lagarto et al. beobachteten, dass die „*autofluorescence lifetime*“ signifikant mit zunehmender Knorpeldegradation abnimmt, mit der Perspektive, das Verfahren in der Arthroskopie einzusetzen [47].

1.5 Ziele

In der vorliegenden Arbeit soll die Arthroskopie unter Anwendung von Autofluoreszenz in Hinsicht auf die visuelle Beurteilbarkeit von Knorpelschäden evaluiert werden. Eine Verbesserung der Beurteilbarkeit würde erhebliche Konsequenzen für die individuelle Therapie von Knorpelschäden bedeuten. Durch eine präzisere Beurteilung wäre die Klassifikation des Ausmaßes des Schadens exakter möglich. Dadurch könnte die optimale Therapie individuell sinnvoller gewählt und angewendet werden. Dabei spielt vor allem die Unterscheidung zwischen Grad II und III nach ICRS und Outerbridge eine bedeutende Rolle.

Ziel der Studie ist es, die Genauigkeit der Klassifikation von Knorpelschäden in der Arthroskopie mit und ohne Verwendung der Autofluoreszenz zu bestimmen und zu vergleichen. Dafür wird der Knorpelschaden im Anschluss an die Arthroskopie unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Dabei wird der Grad an Knorpelschaden als Referenz auf histologischer Ebene bestimmt. Es wird ermittelt, unter welcher Arthroskopie-Methode weniger Abweichungen von der

Einleitung

Referenz auftreten und beurteilt, welche Methode zur präziseren Beurteilung von Knorpelschäden führt.

2 Material und Methoden

2.1 Arthroskopie

2.1.1 Kadaverpräparate

Nach Beratung der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität und des Universitätsklinikums Tübingen bestehen keine Bedenken gegen die Durchführung der Studie (Nr. 009/2020BO2). Die Kadaverknie stammen von freiwilligen Körperspendern. Sie wurden von Science Care Inc., Phoenix, USA bezogen. Bei einem der Knie handelt es sich um ein rechtes, bei den sechs weiteren um linke Knie. Die Knie sind anonymisiert mit einer Kennziffer versehen, es ist lediglich die Seite, das Alter der verstorbenen Person, das Geschlecht und das Gewicht bekannt. Das durchschnittliche Alter der Körperspender beträgt 76 Jahre. Drei der Knie sind von weiblichem Geschlecht und vier von männlichem. Das durchschnittliche Körpergewicht beträgt 65 kg.

Die Knie sind jeweils auf Höhe der Mitte des Ober- und Unterschenkels mit einem glatten Schnitt durch sämtliches Gewebe und den Knochen vom restlichen Körper abgetrennt. Die Haut ist unversehrt, das Kniegelenk ist intakt. Die Muskeln, Sehnen und Knochen sind belassen. Die Präparate werden direkt nach Eintritt des Todes des Spenders tiefgefroren. Sie werden luftdicht und in gefrorenem Zustand bei – 20 °C für drei bis sechs Monate gelagert und werden am Tag vor den geplanten Versuchen für 24 Stunden im Wasserbad bei initial ca. 40 °C heißem Wasser aufgetaut.

2.1.2 Präparation der Kadaverknie

Das aufgetaute Knie wird aus der luftdichten Verpackung ausgepackt (Abbildung 9 A). Mit einem Skalpell werden an der proximalen Seite des Femurs 7 cm des gesamten Weichteilgewebes um den Knochen herum entfernt, sodass dieser freiliegt (Abbildung 9 B). Etwa 2 cm distal des abgesägten Femurstumpfes wird mittels einer Bohrmaschine ein 6 mm breites Loch gebohrt. Eine 6 x 40 mm große Schraube wird mit einem Schraubenzieher in das Loch gedreht (Abbildung 9 C). Die Schraube dient der Stabilität im weiteren Versuchsablauf.

Der für zur stabilen Befestigung des Femurstumpfes benötigte Zement wird aus dem Einbettzeug Kunststoffpulver Technovit 2060 und Universal Liquid (Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland) im Verhältnis 2:1 in einem Behälter mit einem

Material und Methoden

Spatel angerührt. Eine runde Metall-/Plastikhülle wird mit Klebeband an einer Kunststoffunterlage befestigt, damit der Zement nicht zwischen der Hülle und der Unterlage herausläuft. Der angerührte Kunststoff-Zement wird in die Metall-/Plastikhülle gegossen, welche auf der Kunststoffunterlage steht. Die Metall-/Plastikhülle besteht aus einer 6 cm langen Metallröhre mit 3 cm Durchmesser, welche an einer Seite aufgesägt wurde und einer Kunststoffröhre außen darauf. Durch den Schlitz auf einer Seite lässt sie sich gut aufdehnen. Der frei präparierte Teil des Femurstumpfes wird senkrecht in den Zement gesteckt und bis zur Aushärtung etwa 15 min in korrekter Lage positioniert (Abbildung 9 D). Dann wird die Kunststoffplatte entfernt. Der zementierte Femurstumpf wird aus der Plastik-/Metallhülle herausgelöst. Überschüssiger Zement wird mit Hammer und Meißel entfernt (Abbildung 9 E), damit der Stumpf in den Aluminiumzylinder passt. Das Femur wird in den Aluminiumzylinder gesteckt und mit vier Schrauben fixiert (Abbildung 9 F). Distal wird in die Tibia mit einem Hammer ein langer Inbus mit T-Griff geschlagen. Er soll zur Steuerung des Unterschenkels bei der Arthroskopie dienen.

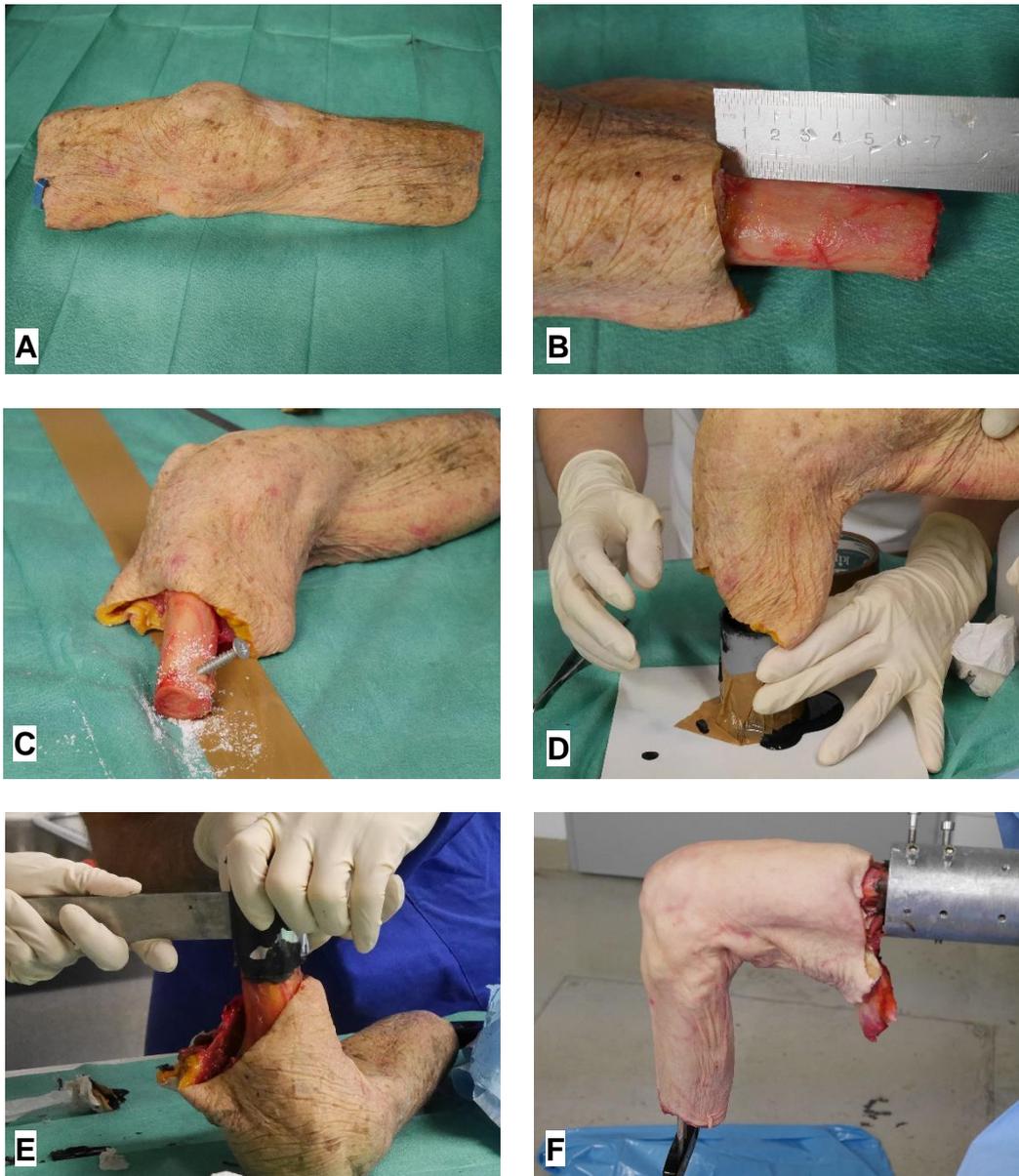


Abbildung 9: Übersicht Kadaverpräparation.

A: Aufgetautes Knie vor der Präparation. B: Man sieht, wie weit das gesamte Gewebe um das Femur entfernt wurde. C: Die Schraube wurde in das gebohrte Loch gedreht. D: Der Zement härtet in der Metall-/Plastikhülse aus. E: Überschüssiger Zement wird entfernt. F: Fixierung des Femurstumpfes im Aluminiumzylinder.

2.1.3 Verwendete Arthroskopiegeräte

Die in der Studie verwendeten Arthroskopiegeräte sind Produkte der Firma Karl Storz SE und Co. KG, Tuttlingen, Deutschland. Am 26'' Full HD-Monitor (Abbildung 11 A) kann in Echtzeit verfolgt werden, was durch die Kamera zu sehen ist. Bild- und Videoaufnahmen werden durch das Dokumentationssystem

Material und Methoden

Karl Storz Aida® zur Aufzeichnung von Standbildern und Videos (Abbildung 11 B) gespeichert. Das Dokumentationssystem hat zwei Kanäle, eine hohe Bildqualität (bis full HD, 3D und 4K), einen Smartscreen (Touchscreen) und einen USB-Adapter. Die Gelenkspülung erfolgt über das Saug- und Spülsystem Arthropump® Power System (Abbildung 11 C). Im Rahmen der durchgeführten Studie wird als Spülflüssigkeit kein NaCl verwendet, sondern Leitungswasser. Dieses wird aus einem Eimer gewonnen und dann über die Single-flow Einstellung bei einem Druck von 40 mmHg eingestellt. Eine Absaugung wird nicht installiert, sondern das Gelenk lediglich durch Überlauf gespült.

Für die Arthroskopie wird der High-Flow Arthroskopschaft mit Snap-In Verschluss verwendet (Abbildung 11 E). Als Standard-Optik dient die Hopkins® Großbild-Weitwinkel-Vorausblick-Optik 30° von Storz (Abbildung 11 F). Als 0°-Optik dient die Hopkins® Großbild-Weitwinkel-Geradeausblick-Optik 0°. Die Optik wird mit dem Ein-Chip-Full-HD-Kamerakopf verbunden.

In den Versuchen wird die IMAGE1 S™ Connect Kameraplattform (Abbildung 11 B) benutzt. Bei dem Kamerasystem ist es möglich, drei „*Visualisierungstechnologien zur Gewebedifferenzierung*“ [18] anzuwenden. Es gibt die Standard-, Chroma-, und Spectra-Einstellung. Die Chroma-Einstellung führt zu Kontrastverstärkung. Die Spectra-Einstellung führt zu Farbtonverschiebung und -vertauschung, sie wird aber in der Arbeit nicht angewandt. Als Lichtquelle wird die Kaltlicht-Fontäne D-light C/AF SCB von Storz (Abbildung 11 D) mit einer 300 Watt Xenonbirne verwendet. Außerdem wird die Opal1® Technologie des Image1 S™ Connect Kamerasystems von Storz eingesetzt. Durch einen Fußpedalschalter (4-pedal footswitch) kann man zwischen UV-Licht und Standard-Licht umschalten. Es wird kein Fluorochrom in der Arthroskopie verwendet. Unter UV-Licht wird lediglich die Autofluoreszenz des Gewebes betrachtet. Das Anregungslicht umfasst das Spektrum von 380 – 430 nm. Durch eine schwache bläuliche Hintergrundbeleuchtung im Bereich von 430 – 470 nm [38] soll die Umgebung im Bild gut ersichtlich sein, störende Überlagerung der Farben wird vermieden. Neben dem Umschalten zwischen den Einstellungen Standard und Chroma und zwischen Standard-Weißlicht und UV-Licht gibt es noch drei Filtereinstellungen: „ALA“, „W“ und „AF“.

Material und Methoden

Die Filter sind direkt vor der Kamera eingebaut, sodass nur bestimmte Wellenlängen des emittierten Lichts sichtbar werden. Die Filter im Endoskop unterdrücken den Wellenbereich des Anregungslichtes und lassen gleichzeitig einen möglichst großen Teil des Emissionsspektrums durch. Anhand eines Langpass-Filters wird der kurzwellige Teil des Lichts gesperrt.

„ALA“ steht für 5-Aminolävulinsäure. 5-Aminolävulinsäure ist das Ausgangsprodukt der Häm-Synthese im Körper. Der „ALA“-Filter lässt Wellenlängen im Bereich von 450 - 1000 nm durch, dadurch erscheint das Bild bläulich-grün (Abbildung 12 B). Bei der Einstellung „W“ wird das untersuchte Gelenk ohne Filter betrachtet. Das Spektrum sichtbaren Lichts (400 – 750 nm) wird durchgelassen [38] (Abbildung 12 C). Es handelt sich um standardmäßig zur Beobachtung in der Arthroskopie verwendetes Licht mit reduziertem Weißanteil. Der „AF“-Filter ist ein Autofluoreszenz-Filter, er lässt Wellenlängen zwischen 470 nm und 1000 nm durch. In den Versuchen wird eine Kombination der Einstellungen Standard und Chroma mit jeweils einem der drei Filter verwendet. Die Kombination „Standard / W / Weißlicht“ stellt die in einer Arthroskopie standardmäßig verwendete Beleuchtung dar (Abbildung 12 A). Die Betrachtung und Dokumentation des Knorpels erfolgen unter Kombination der Einstellungen nach einem in Abbildung 10 dargelegten Schema.

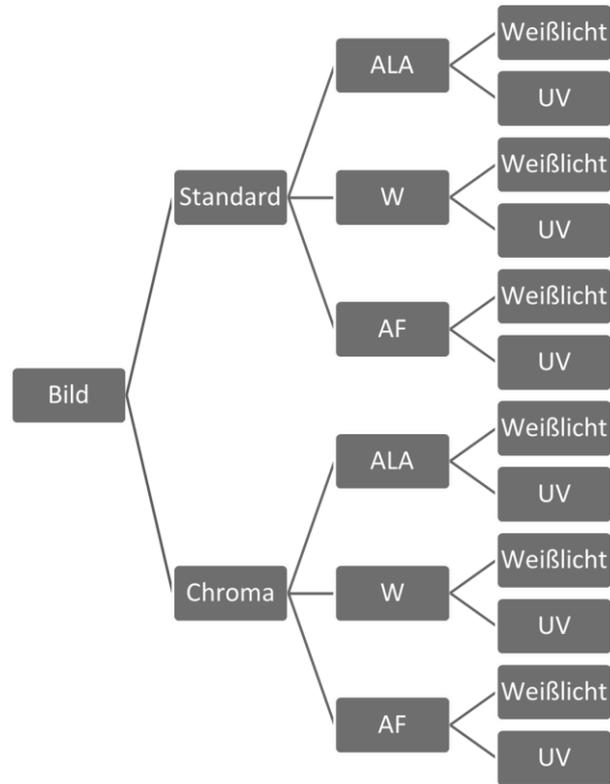


Abbildung 10: Übersicht über die Anwendung von Filterkombinationen.

Material und Methoden

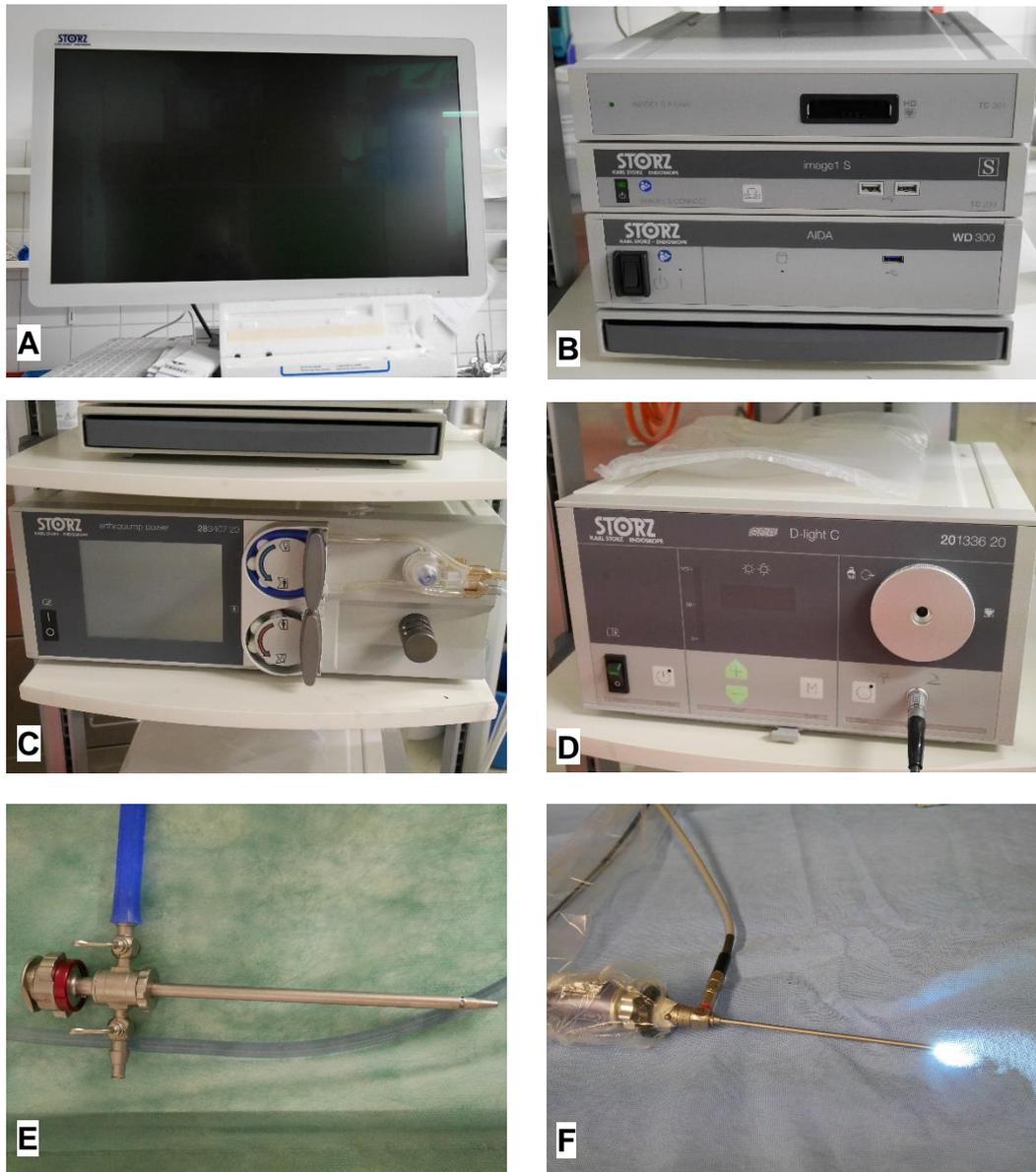


Abbildung 11: Verwendete Arthroskopiegeräte der Firma Storz.
A: Monitor. B: Aida Dokumentationssystem und Image1 Plattform. C: Arthropump Power System. D: Lichtquelle D-Light C. E: verwendeter Arthroskopschaft. F: mit dem Kamerakopf verbundene 30°-Optik.

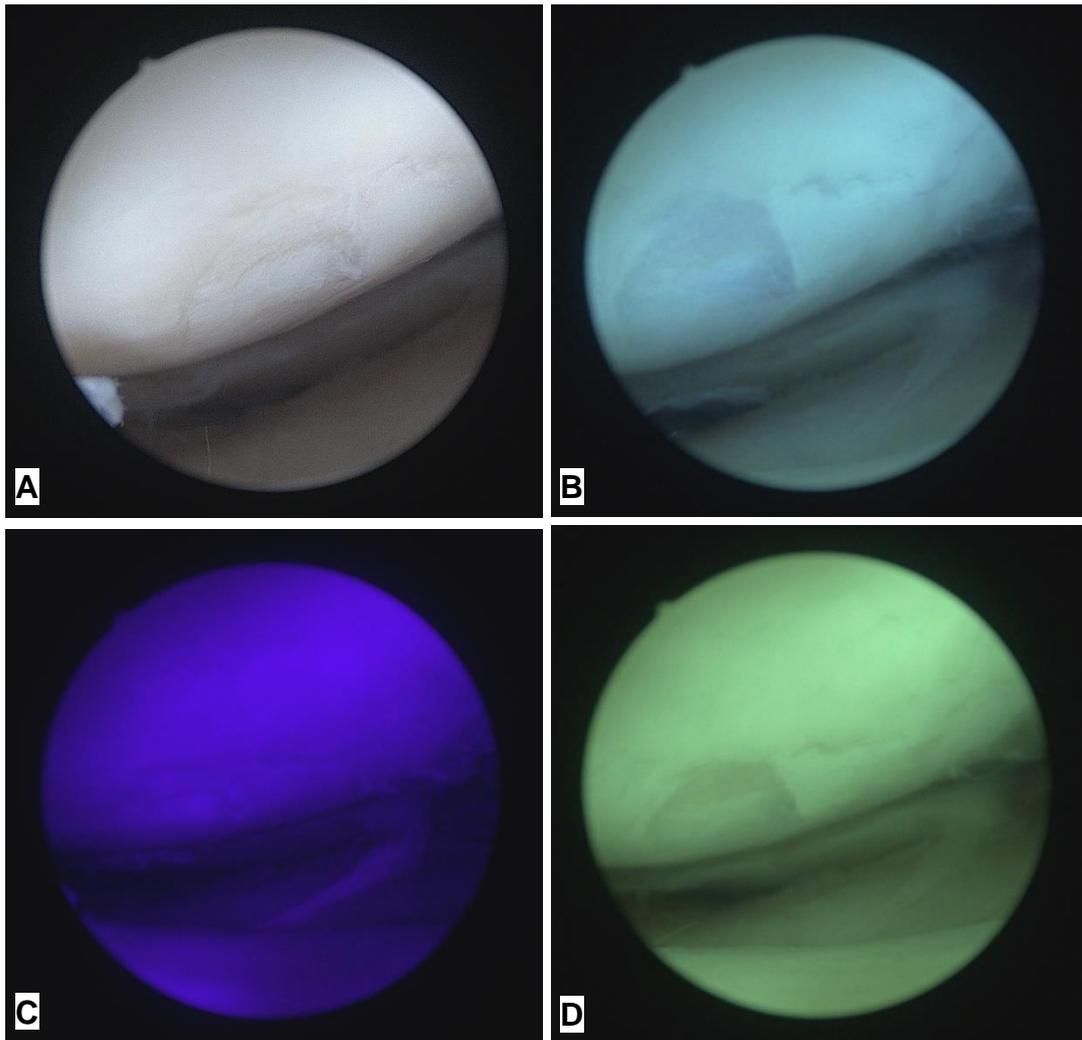


Abbildung 12: Übersicht über die angewendeten Filter am Beispiel des ersten Knorpelschadens.

A: Arthroscopie-Bild unter Standardbedingungen. B: Filter „ALA“. C: Filter „W“. D: Filter „AF“, jeweils unter Autofluoreszenz.

2.1.4 Durchführung der Arthroscopie

Für die Arthroscopie wird der Kamerakopf mit der Optik verbunden. Das anterolaterale Portal (Abbildung 13) wird als Zugang zum Gelenk eröffnet. Dazu wird mit einem Skalpell ein 8 mm langer Schnitt 0,5 – 1 cm lateral der Patellarsehne gemacht (Abbildung 14 A) und das Skalpell in Richtung Fossa intercondylaris vorgeschoben, bis die Gelenkkapsel durchstoßen wird. Durch das Portal wird der Trokar stumpf ins Gelenk eingeführt und es kann die 30°-Optik eingesetzt werden (Abbildung 14 B).

Material und Methoden

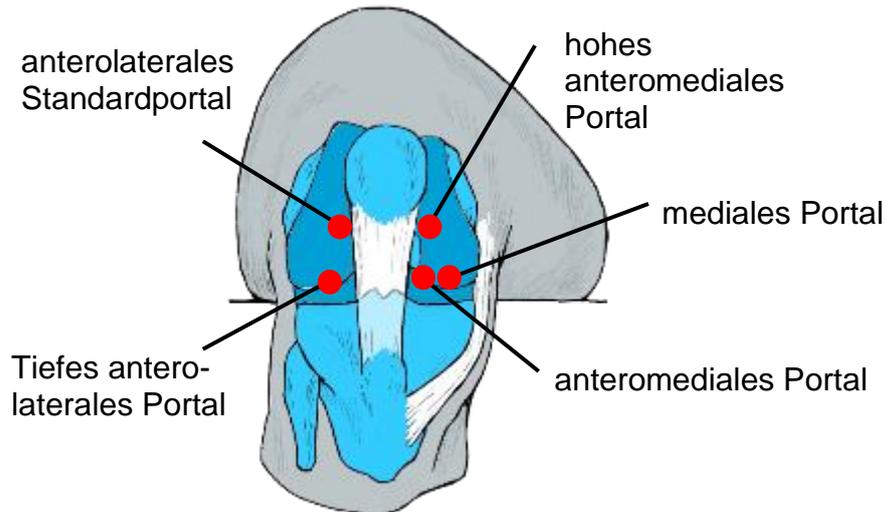


Abbildung 13: Arthroskopieportale am Kniegelenk (modifiziert nach [32]).

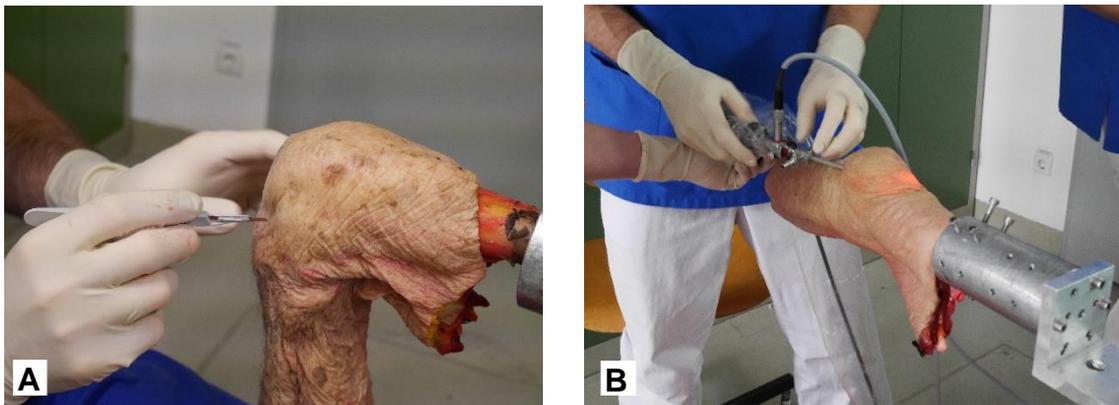


Abbildung 14: Durchführung der Arthroskopie.
A: Stichinzision zum Anlegen des anterolateralen Portals. B: Arthroskopischer Rundgang.

Es erfolgt zunächst ein diagnostischer Rundgang des Knies (Abbildung 15). Beim diagnostischen Rundgang wird zunächst der Patellaknorpel und der Knorpelüberzug des patellofemorales Gleitlagers dargestellt. Darauf folgt die Ansicht der suprapatellaren, lateralen und medialen Recessus und des Innenmeniskus. Der Innenmeniskus sowie der tibiofemorale Knorpelüberzug werden betrachtet. Es folgt die Darstellung und Beurteilung der Kreuzbänder. Im lateralen Kompartiment werden der Außenmeniskus und der tibiofemorale Knorpel beurteilt. Dokumentiert wird die arthroskopische Untersuchung des Knies durch Aufnahme von Standbildern und Videos.

Material und Methoden

Nach Beurteilung und Klassifikation der Knorpelbeschaffenheit wird eine isolierte Schädigung zur weiteren Beurteilung dargestellt. Die Lokalisation des ausgewählten Schadens wird in der verwendeten Schablone festgehalten (2.1.5). Der Knorpelschaden wird unter Anwendung der Filter mit und ohne Autofluoreszenz nach Schema betrachtet und bildlich dokumentiert. Zur Vermeidung einer besseren Beurteilung des Knorpelschadens mittels Tasthaken wurde die Palpation des Knorpelschadens explizit nicht durchgeführt.

2.1.5 Datenerfassung der arthroskopischen Knorpelschäden

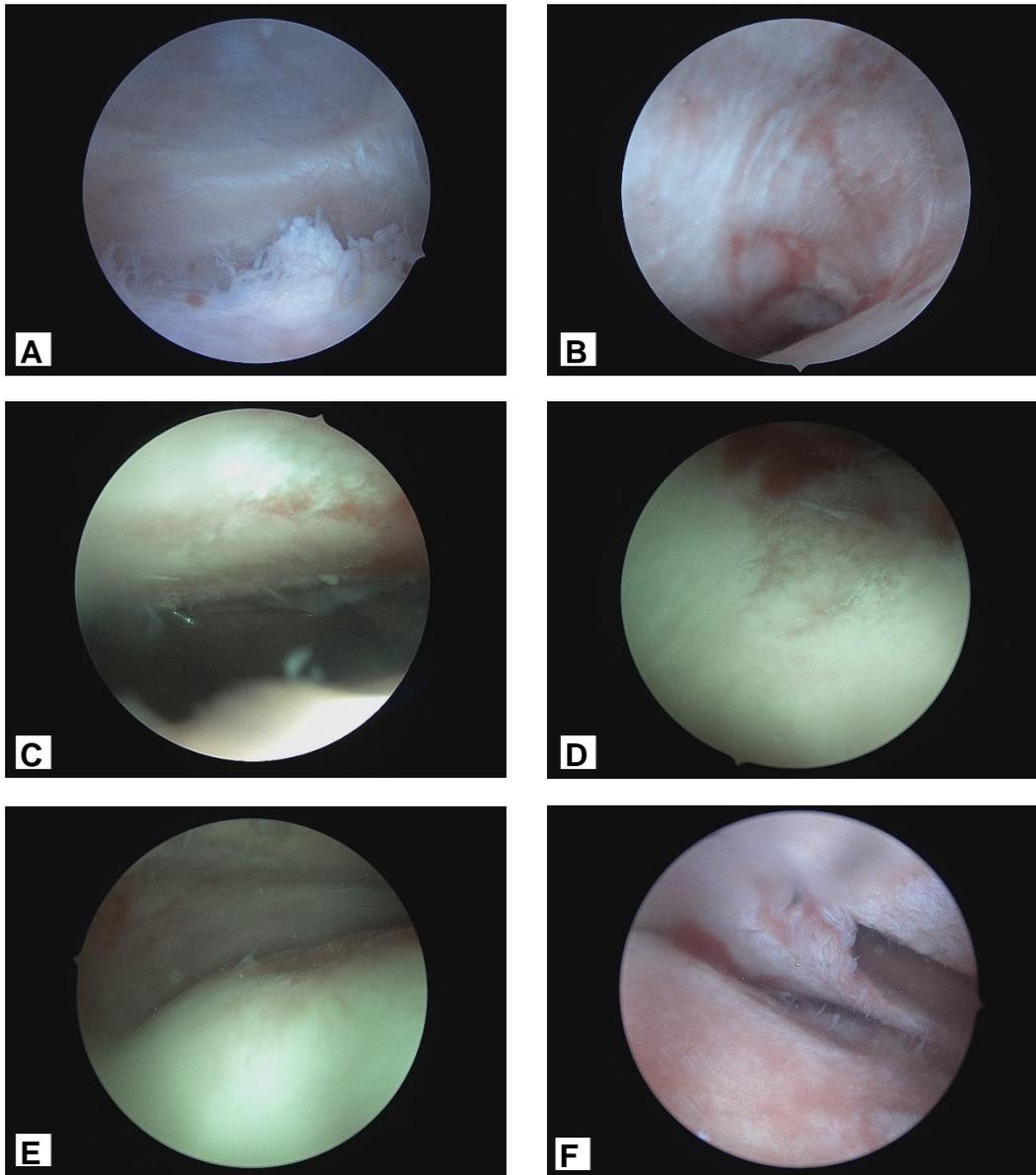


Abbildung 15: Ausschnitte aus dem diagnostischen Rundgang durch das linke Knie.

A: Oberer Rezessus. B: Popliteusschlitze. C: Rückseite der Patella. D: Patellofemorales Gleitlager. E: Medialer Femurkondylus. F: Medialer Anteil des Tibiaplateaus.

Die Knorpelschäden aus der Arthroskopie werden neben der bildlichen Dokumentation auch in einer Schablone festgehalten. Es handelt sich dabei um Umriss des Knorpelabdruckes der jeweiligen Gelenkflächen von Femur, Patella und Tibiaplateau (Abbildung 16). Die Lokalisation der Knorpelschäden wird in der Schablone eingezeichnet.

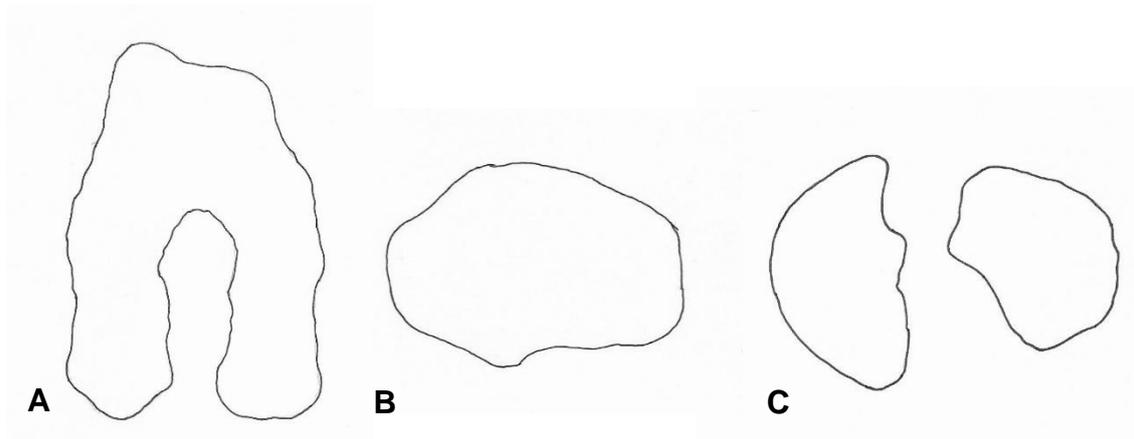


Abbildung 16: Schablonen der Gelenkflächen des Knies.
A: Abdruck der Gelenkfläche des linken Femurs. B: Abdruck der Rückseite der Patella. C: Gelenkfläche der Tibia.

2.1.6 Knorpelgewinnung für die histologischen Versuche

Nach der Arthroskopie wird zunächst der Unterschenkel vom Oberschenkel vollständig abpräpariert (Abbildung 17 A). Der für die weiteren Versuche ausgewählte Knorpelschaden wird in situ lokalisiert. Mit einer Knochensäge wird der Knorpelschaden in einer möglichst dünnen subchondralen Knochenscheibe von 1 – 3 mm vom Präparat abgesägt (Abbildung 17 C, D). Eine möglichst dünne Probe ist wichtig für die Fixierung. Wenn die aus dem Knie gewonnene Probe dicker ist, muss etwas Knochen herausgefräst werden. Das abgesägte Stück wird markiert. An der Seite der Probe, welche in situ nach ventral kranial gezeigt hat, wird mit dem Skalpell eine Ecke herausgeschnitten. Zweck der Markierung ist, dass sich während den mikroskopischen Untersuchungen nach wie vor nachweisen lässt, wie die Probe in situ lokalisiert war. Die gewonnene Probe wird in PBS-Pufferlösung (Phosphate Buffered Saline) in einem Behälter konserviert und bis zur weiteren Verarbeitung bei 2 – 8 °C gekühlt.

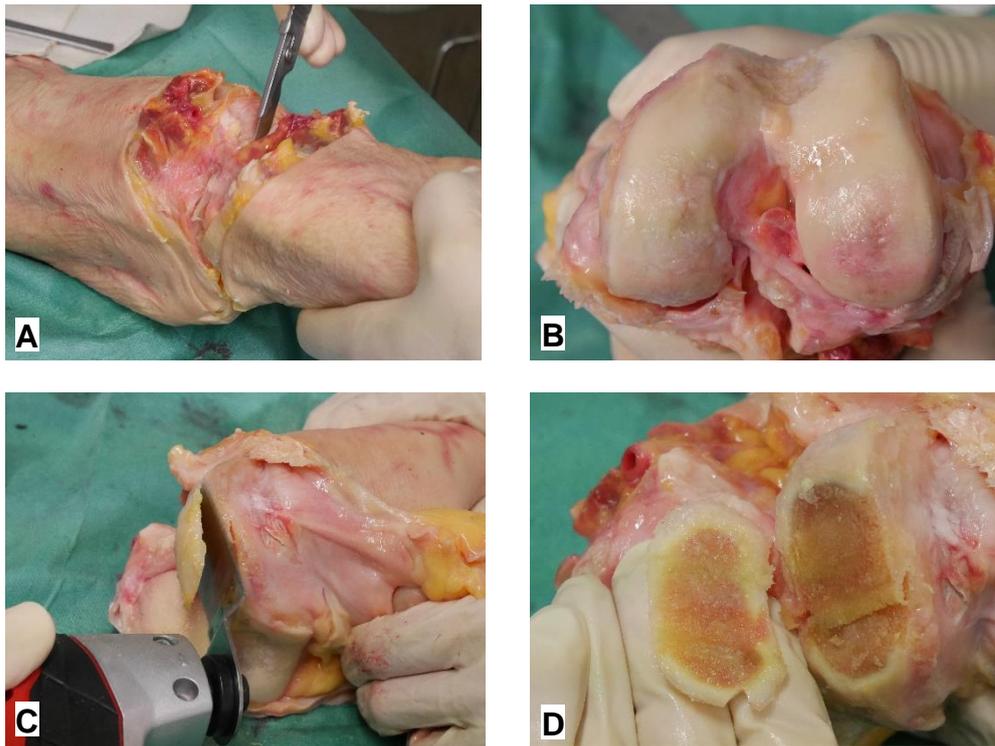


Abbildung 17: Knorpelgewinnung für die histologischen Versuche. A: Abtrennung des Unterschenkels vom Oberschenkel. B: Freigelegter Femurknorpel. C: Absägen der Knorpelprobe. D: Abgesägtes und markiertes Knorpel-/Knochenstück.

2.1.7 Auswertung der Knorpelschäden im Zuge der Arthroskopie

In der Arthroskopie werden insgesamt 108 Bilder von neun Knorpelschäden aufgenommen, davon 54 mit Autofluoreszenz und 54 ohne. Für die Objektivierung der Auswertung werden alle Bilder, die nicht unter Verwendung von Autofluoreszenz aufgenommen wurden, gedoppelt. Über die zweite Version der Weißlicht-Bilder wird ein künstlich grüner Filter gelegt. Dadurch gleichen die Bilder mit grünem Filter denen unter Anwendung des „AF“-Filters. Die Bilder dienen der Kontrolle der Objektivität bei der Beurteilung der Standardbilder gegenüber der Fluoreszenzaufnahmen. Die insgesamt 162 Bilder werden per Zufall nummeriert und angeordnet.

Drei Beurteiler, darunter zwei Assistenzärzte im ersten und vierten Weiterbildungsjahr und ein Oberarzt der Orthopädie und Unfallchirurgie, werten getrennt die Bilder aus und klassifizieren die Schäden nach Outerbridge. Außerdem wird die Befundungsqualität, die Größe des Schadens und die

Material und Methoden

Darstellbarkeit von Fissuren beurteilt. Anhand der Befundungsqualität soll über die Verwendbarkeit des Datensatzes und die weitere Auswertung entschieden werden. Die Größe wird von den Observern am Computer in Pixeln ausgemessen.

Für die Belastbarkeit der Ergebnisse sollen die äußeren Bedingungen gleich sein. Die Auswertung erfolgt in Dunkelheit und stets am gleichen Bildschirm (Abbildung 18). Drei Observer beurteilen und klassifizieren die Bilder zunächst getrennt in zwei Auswertungsrunden im Abstand von vier Wochen. Anschließend sollen die Beobachter gemeinsam Arthroskopie-Bilder mit Knorpelschäden, die nicht dem Projekt angehören, unter den gleichen äußeren Bedingungen auswerten. Ein einheitlicher Bewertungsmaßstab soll dadurch etabliert werden. Im Anschluss beurteilen die Beurteiler erneut getrennt die Aufnahmen wie in Runde eins und zwei. Für die Auswertung werden drei verschiedene Untersucher herangezogen, um die Übereinstimmung mit der Interraterreliabilität zu testen. Die ersten beiden Auswertungsrunden mit zeitlichem Abstand dienen der Testung der Intraraterreliabilität jedes Observers. Das gemeinsame Auswerten fremder Knorpelschäden und anschließend erneut getrenntes Auswerten mit Testung der Interraterreliabilität dient der Evaluation des Effektes der Schulung auf die Interraterreliabilität.

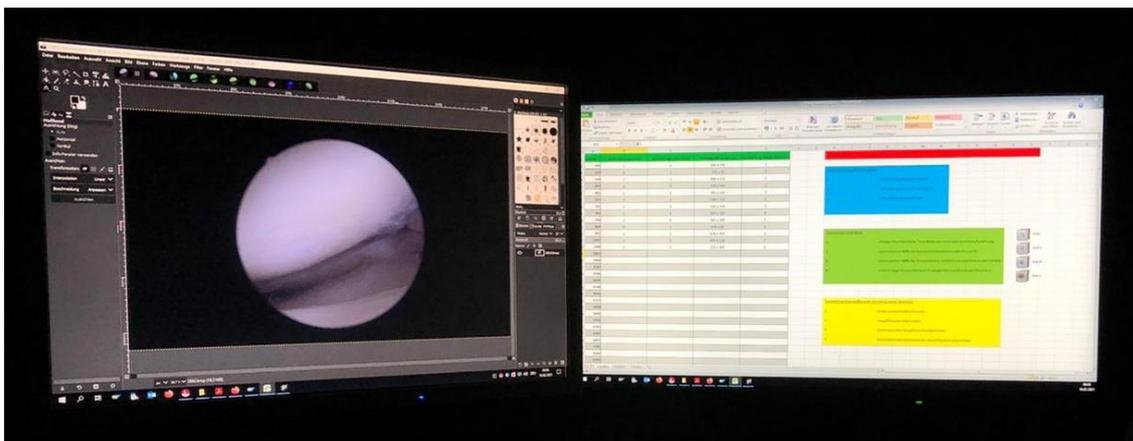


Abbildung 18: Standardisiertes Setting zur Auswertung der Arthroskopiebilder.

2.2 Histologische Kontrollversuche

2.2.1 Fixierung

Zunächst wird die Knorpel-/Knochenprobe in PBS-Lösung gewaschen. Dafür wird die Probe mit PBS-Lösung bedeckt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Vorgang wird dreimal wiederholt. Dann wird die Flüssigkeit aus dem Gefäß entfernt. Das Präparat wird in einem Gefäß mit PFA 4 % (Formaldehyd) bedeckt und für 0,5 – 3 Stunden bei Raumtemperatur (21 °C) fixiert. Die benötigte Zeit ist abhängig von der Dicke der Probe. Die Eindringgeschwindigkeit des verwendeten Formaldehyds beträgt 1 mm/h.

2.2.2 Entkalken

Die PFA-Lösung wird vollständig aus dem Behälter entfernt und das Knorpelstück wird mit EDTA-Lösung (20 %) bedeckt. In der Lösung wird die Probe für zwei bis drei Tage bei 37 °C im Schüttler inkubiert (Abbildung 19). Danach wird die Lösung mit neuer EDTA-Lösung ausgetauscht und der Prozess wiederholt, bis die Probe entkalkt ist. Der gesamte Entkalkungsprozess ist abhängig von der Dicke der Probe und dauert sieben Tage bis vier Wochen.

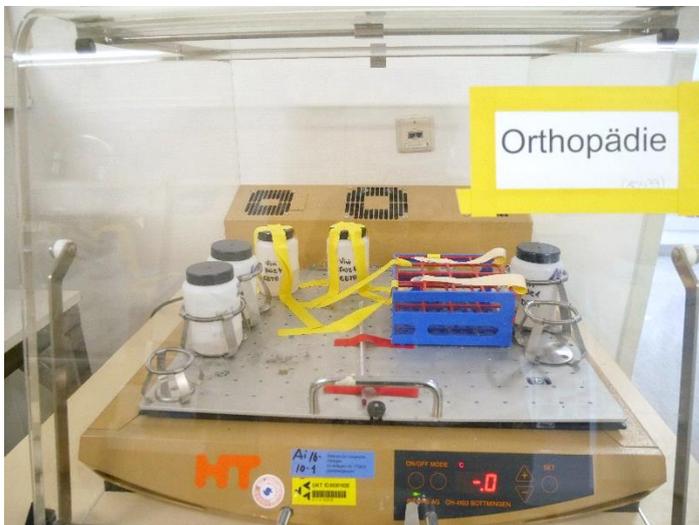


Abbildung 19: Schüttler mit Knorpelproben in EDTA-Lösung in Behältern.

2.2.3 Schneiden am Kryotom

Aus dem entkalkten Knorpel (Abbildung 20 A) müssen zunächst geeignete Proben für die weiteren Versuche gewonnen werden. Dazu wird der Knorpel in

Material und Methoden

der Mitte des Defektes mit einem Skalpell in zwei Hälften geteilt. Die beiden Hälften werden an den äußeren Enden gekürzt, bis die Präparate etwa so lang sind, dass sie in ein Reaktionsgefäß von 1,5 ml passen. Die Hälften werden jeweils erneut geschnitten, und zwar parallel zum mittleren Schnitt, sodass zwei dünne Scheiben von 3-5 mm Dicke entstehen. Das rechte der zurechtgeschnittenen Knorpelstücke soll am Kryotom zu dünnen Querschnitten verarbeitet werden. Das linke Stück wird später als flächiges Präparat unter Draufsicht (Top-Down-Präparat) mikroskopiert. Das Präparat soll möglichst flach sein, ca. 1 mm. Dafür wird von der Unterseite eine zur Knorpeloberfläche parallele Scheibe abgeschnitten. Falls noch Knochengewebe am Präparat ist, wird dieses hier möglichst vollständig entfernt. Bei der Gewinnung des Knorpels für die mikroskopischen Versuche (2.1.6) wurde die Seite des vom Femur abgesägten Knorpels markiert, die in situ nach ventral kranial gezeigt hat. Die Markierung soll an beiden Knorpelstücken beibehalten werden, damit beim Mikroskopieren eine Orientierung möglich ist. An dem flächigen Präparat wird zur Markierung unter Draufsicht das Ende schräg abgeschnitten, welches im entkalkten Knorpel in Richtung der ursprünglichen Markierung zeigte. Bei dem Präparat, welches am Kryotom geschnitten werden soll, erfolgt eine Ansträgung als Markierung unter Sicht des Querschnitts der Längsseite (Abbildung 20 B). Die angefertigten Präparate werden in einem Versuchsröhrchen mit PBS-Lösung bedeckt.

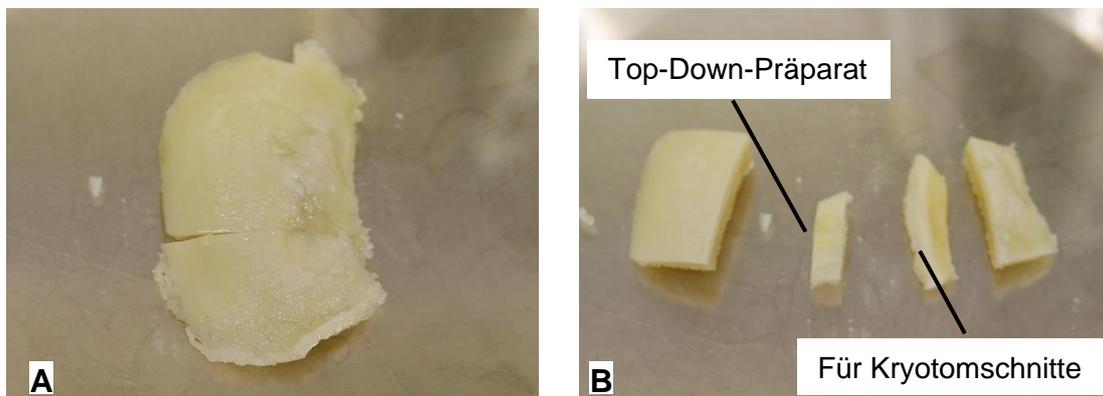


Abbildung 20: Schneiden der Probe.

A: Entkalkte Knorpelprobe (in 2.1.6 entnommen). B: Zurechtgeschnittene Probe mit Markierung für die weiteren Versuche.

Material und Methoden

Für die Kryotomschnitte wird der Kryostat CM1860 UV der Firma Leica, Wetzlar, Deutschland verwendet (Abbildung 21 A, D). Das Kryotom ist ein Gerät, mit dem unter sehr kalten Temperaturen dünne Schnitte an Proben vorgenommen werden können. Die Temperatur beträgt $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$. Durch die Kälte wird die Probe härter und sie kann leichter geschnitten werden. Die Schnittdicke kann zwischen $1\text{ }\mu\text{m}$ und $1000\text{ }\mu\text{m}$ Dicke eingestellt werden. Die vertikale Schnittlänge beträgt 60 mm [49].

Am Kryotom wird zunächst etwas Kleber (Tissue Tek) auf einen kalten Objekthalter gegeben. Sobald der Kleber fest ist, wird das Präparat auf den Kleber gelegt. Dabei soll die Schnittebene, welche im entkalkten Präparat am linken Rand durch den Knorpelschaden ging, nach oben zeigen (Abbildung 21 B). Man sollte also den Querschnitt der Längsseite mit dem Defekt erkennen. Der Knorpel wird mit Tissue Tek bedeckt (Abbildung 21 C). Die Einbettung des Präparates in Tissue Tek dient der Fixierung, damit das Präparat in der gewünschten Position geschnitten wird. Es wird gewartet, bis der Kleber bei $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ ausgehärtet ist (Abbildung 21 E), dann wird der Objekthalter auf dem Block eingespannt und mit einer Schraube fixiert. Zum Schneiden werden 818er Klingen der Firma Leica verwendet. Die Schnittdicke wird auf $35\text{ }\mu\text{m}$ eingestellt. Zum Schneiden wird die Kurbel langsam im Uhrzeigersinn gedreht. Dadurch wird die Probe jeweils um die eingestellte Schnittdicke von $35\text{ }\mu\text{m}$ horizontal vorgeschoben und in der Ebene der Schraubenfläche eine Scheibe von $35\text{ }\mu\text{m}$ vom Präparat abgeschnitten. Es wird der Teil des Präparates und Klebers entfernt, der auf dem Objekthalter zuoberst liegt. Zunächst wird der überschüssige, das Präparat bedeckende, Kleber in Scheiben abgeschnitten (Abbildung 21). Es werden weiter Scheiben abgeschnitten, bis das Präparat und der Schaden in seiner vollen Länge frei liegen. Nun werden 6 – 10 Schnitte angefertigt, die den weiteren Versuchen dienen. Es handelt sich dabei um vertikale Längsschnitte. Die fertigen Kryotomschnitte werden auf einen Objektträger gegeben, welcher in eine Petrischale gelegt wird (Abbildung 22).

Material und Methoden

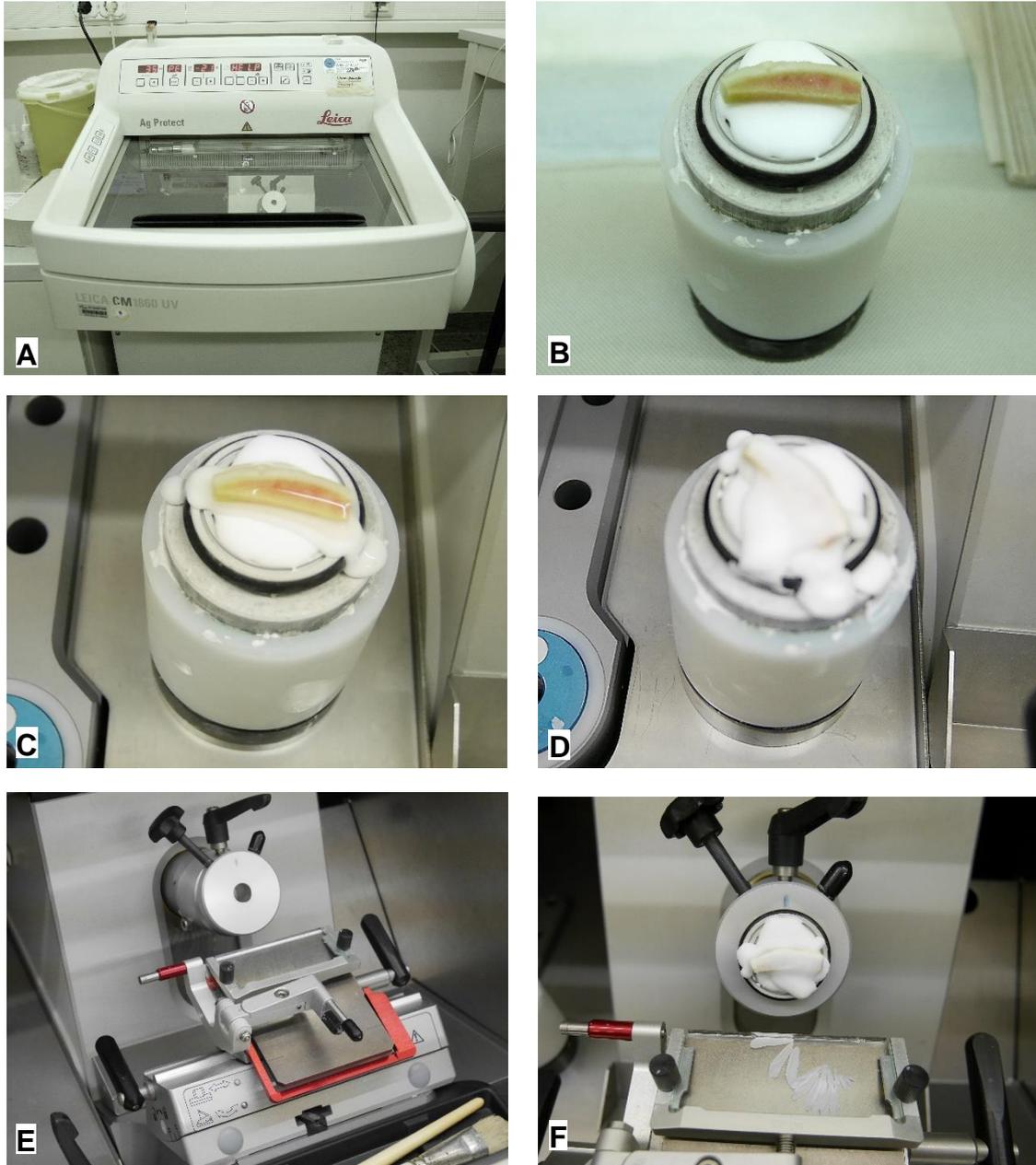


Abbildung 21: Anfertigung der Schnitte am Kryotom.

A: Leica CM1860 UV-Kryostat. B: Knorpelprobe auf dem ausgehärteten Tissue Tek. C: Durchsichtiger, flüssiger Kleber. D: Weißer, ausgehärteter Kleber. E: Kryokammer mit Klingenhalter und Block zum Einspannen des Objekthalters. F: Anfertigung der Kryotomschnitte.

2.2.4 DAPI-Färbung

DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der speziell DNS markiert. Von dieser Eigenschaft wird Gebrauch gemacht bei der spezifischen Darstellung von Zellkernen. DAPI lagert sich bevorzugt an DNS-Abschnitte der kleinen Furche

Material und Methoden

an, die reich an den DNS-Bausteinen Adenin und Thymin sind [14, 93]. Das Absorptionsmaximum von DAPI liegt bei 358 nm und das Emissionsmaximum bei 461 nm. Durch ultraviolettes Licht wird der DAPI-Farbstoff angeregt und emittiert im kurzwelligen blauen Bereich [36]. DAPI kann die Membran einer Zelle schwer durchdringen. Deshalb eignet sich der Farbstoff vor allem für fixierte Präparate [81]. Der DAPI-Farbstoff hat mutagene Eigenschaften. Der Farbstoff interkaliert auch in RNS. Jedoch beträgt die Fluoreszenz lediglich 20 % derer des an DNS gebundenen DAPI [45]. Der DAPI-RNS-Komplex hat mit 500 nm ein höheres Emissionsmaximum als der DAPI-DNS-Komplex. Die Emissionsmaxima von DNS und RNS gebundenem DAPI unterscheiden sich damit genug, um von optischen Farbfiltern im Fluoreszenzmikroskop getrennt zu werden [14].

Die Kryotomschnitte auf den Objektträgern werden zunächst in PBS-Lösung eingeweicht. Es werden zwei Reaktionsgefäße mit einem Fassungsvermögen von 1,5 ml mit je 800 µl PBS befüllt. Anschließend werden die Kryotomschnitte von Präparat 1 mittels Pinzette in das eine Gefäß und das flächige Präparat 2 in das andere Gefäß gelegt. Da der DAPI-Farbstoff lichtempfindlich ist, muss auf Dunkelheit am Arbeitsplatz geachtet werden.

Für die DAPI-Färbung wird mit der Stammlösung zuerst eine 1:1000 Verdünnung durchgeführt. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit von DAPI wird Alufolie um das Versuchsröhrchen gewickelt. Es entstehen 3 ml DAPI-Lösung der Konzentration 1 µg/ml (Abbildung 22 B). Aus den zwei 1,5 ml Reaktionsgefäßen wird die gesamte Flüssigkeit abpipettiert. Nachfolgend werden je 500 µl der verdünnten DAPI-Lösung in jedes der beiden Reaktionsgefäße hinzugefügt. Im nächsten Arbeitsschritt werden diese im Thermomixer comfort der Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland für 10 min bei 600 rpm bei 20°C inkubiert (Abbildung 22 C). Anschließend wird die gesamte Flüssigkeit abpipettiert (Abbildung 22 D). Die Präparate werden nun mit PBS gewaschen. Dafür werden in jedes Reaktionsgefäß 500 µl PBS gegeben, sodass die Präparate bedeckt sind. Die Reaktionsgefäße werden für 5 min bei 20 °C in den Thermomixer gegeben. Der Waschprozess wird einmal wiederholt.

Zwei Objektträger werden beschriftet. 2 – 3 Kryotomschnitte werden auf einen Objektträger mit einer Pinzette gegeben. Dabei ist darauf zu achten, dass die

Material und Methoden

Schnitte auf die volle Länge ausgebreitet sind und sich nicht überlagern (Abbildung 22 E). Auf jeden Schnitt wird ein Tropfen Dako Fluorescence Mounting Medium gegeben. Durch die Verwendung von Fluorescence Mounting Medium wird das Ausbleichen der Immunfluoreszenz während des Mikroskopierens reduziert. Das Deckglas wird seitlich darauf abgelegt. Es wird darauf geachtet, dass keine Luftblasen entstehen.

Das flächige Top-Down-Präparat wird auf den zweiten Objektträger gelegt und mit einem Tropfen Fluorescence Mounting Medium bedeckt. Statt eines Deckglases wird ein weiterer Objektträger auf dem Präparat platziert. Die Konstruktion wird durch das seitliche Anbringen von Gummibändern stabilisiert (Abbildung 22 F). Das Top-Down-Präparat sollte nicht länger als 30 min auf den Objektträgern gelassen werden, da seitlich Luft an das Präparat gelangt, welche das Präparat austrocknen lässt.

Material und Methoden

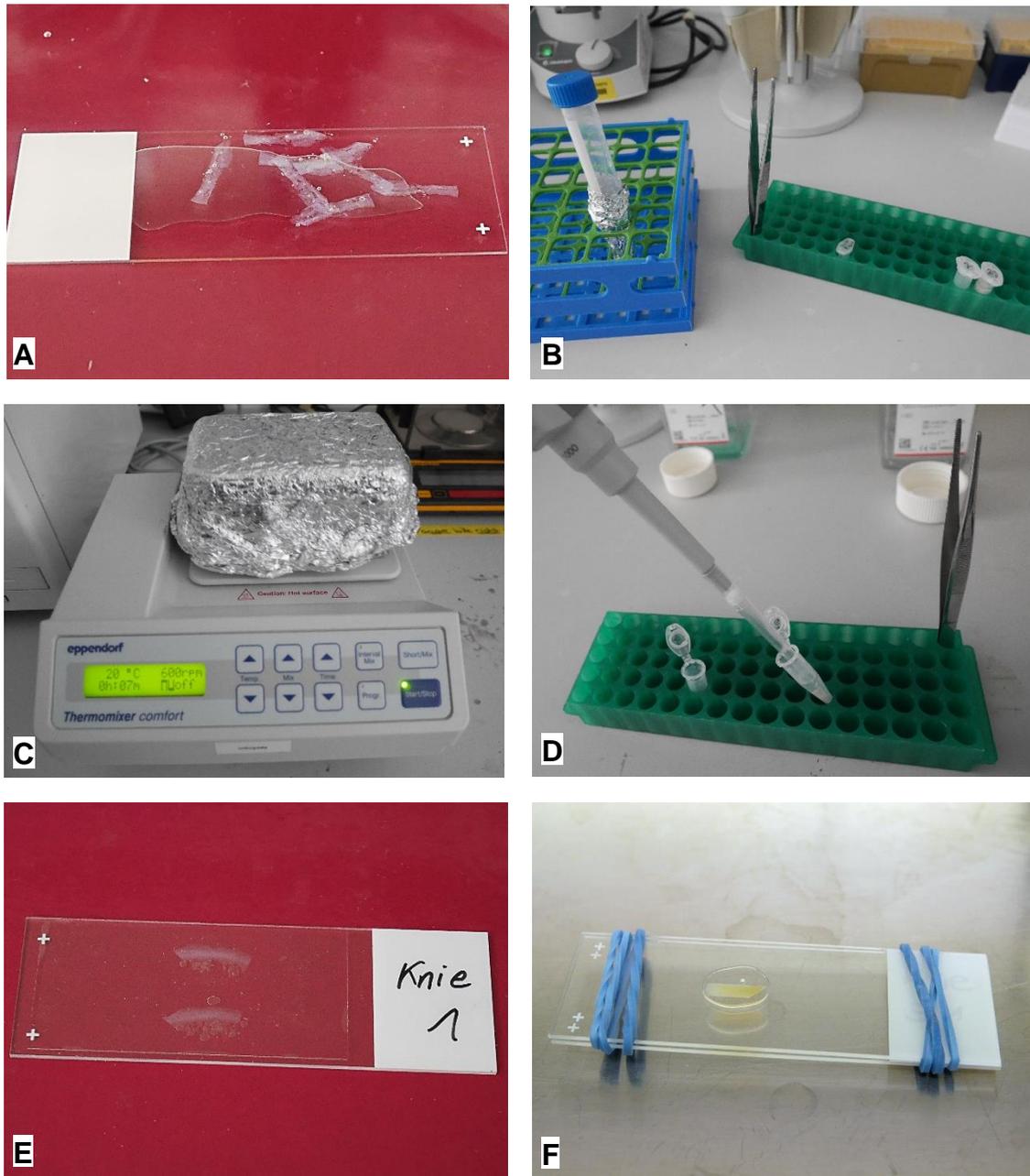


Abbildung 22: DAPI-Färbung und Anfertigung von Präparaten zum Mikroskopieren.

A: angefertigte Kryotomschnitte in der Petrischale. B: hergestellte DAPI-Lösung und 1,5 µl Reaktionsgefäße mit den Präparaten. C: verwendeter Thermomixer. D: Abpipettieren von Flüssigkeit. E: fertiges Präparat mit zwei Kryotomschnitten. F: fertige Konstruktion mit dem Top-Down-Präparat.

2.2.5 Aufnahme von Mosaikbildern am Laser Scanning Mikroskop

Fluoreszenzmikroskopie bezeichnet eine spezielle Form der Lichtmikroskopie. Als Lichtquelle dient eine Quecksilber-Höchstdrucklampe oder eine LED-Lampe. Das Licht trifft zunächst auf einen Anregungsfilter. Den Anregungsfilter passiert nur das ultraviolette Licht. UV-Licht umfasst Wellenlängen von 100 – 380 nm und liegt damit außerhalb des für den Menschen sichtbaren Spektrums. Das UV-Licht trifft im Anschluss auf das zu untersuchende mit Fluorochrom gefärbte Präparat. Im Objektiv wird das emittierte Fluoreszenzlicht gesammelt. Von einem dichromatischen Strahlenteiler wird das Fluoreszenzlicht vom Anregungslicht geteilt, und, da es eine größere Wellenlänge aufweist, durchgelassen. Vom Präparat reflektiertes Anregungslicht und unerwünschte Autofluoreszenz werden vom Strahlenteiler nicht durchgelassen, sondern nahezu vollständig reflektiert. Ein geringer Teil des störenden Lichts gelangt trotzdem durch den Strahlenteiler und wird durch einen selektiven Detektionsfilter zurückgehalten. Über die Tubuslinse und das Okular wird aus dem Fluoreszenzlicht das mikroskopische Bild erzeugt (Abbildung 23).

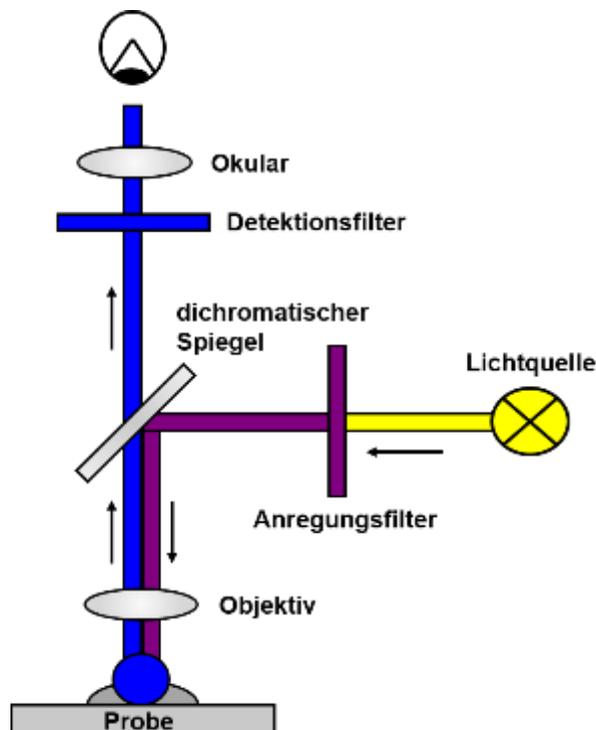


Abbildung 23: Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops.

Material und Methoden

In der vorliegenden Arbeit wird das Laser Scanning Mikroskop (LSM) 510 der Firma Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland verwendet. Das Mikroskop hat drei Fluoreszenzkanäle. In der Arbeit wird der DAPI-Kanal mit blauem Licht verwendet.

Für die Auswertung werden die Kryotomschnitte und das flächige Präparat am LSM mit dem Computer mithilfe des Programms Axio Vision 4.8 betrachtet. Es wird das 10er Objektiv gewählt, die LED 365 Lichtquelle und der DAPI-Kanal. Zunächst wird das Präparat am Okular des Mikroskops betrachtet und die richtige Schärfe eingestellt. Dann wird ein Bildausschnitt am Computer betrachtet. Über die Schaltfläche „Exposure time“ wird die Belichtungszeit angepasst, außerdem müssen Hintergrundbeleuchtung und Helligkeit individuell für jedes Präparat eingestellt werden. Über die Funktion „MosaiX“ kann man einen Bildausschnitt einer gewünschten Größe vom Mikroskop scannen lassen. Dabei werden einzelne Aufnahmen von der Kamera AxioCam gemacht, die später vom Programm Axio Vision zusammengesetzt werden. Um das gesamte Präparat aufzunehmen, muss das Mosaik-Gitter an die Ränder des Präparates angepasst werden. Für jedes Mosaikbild im angepassten Gitter muss die Schärfe individuell angepasst und gespeichert werden. Anschließend wird der Scanvorgang gestartet. Während des Scanvorgangs sollte jedes Störlicht vermieden werden und der Raum komplett abgedunkelt sein. Während der Aufnahme der Bilder wird das Präparat vom Mikroskop mäanderförmig abgefahren. Die fertigen Einzelbilder werden von Axio Vision automatisch zusammengesetzt. Die Bilder werden mit einer geringen Überlappung (engl.: Overlap) aufgenommen, der Overlap muss anschließend herausgerechnet werden. Die fertigen Bilder werden gespeichert (Abbildung 24).

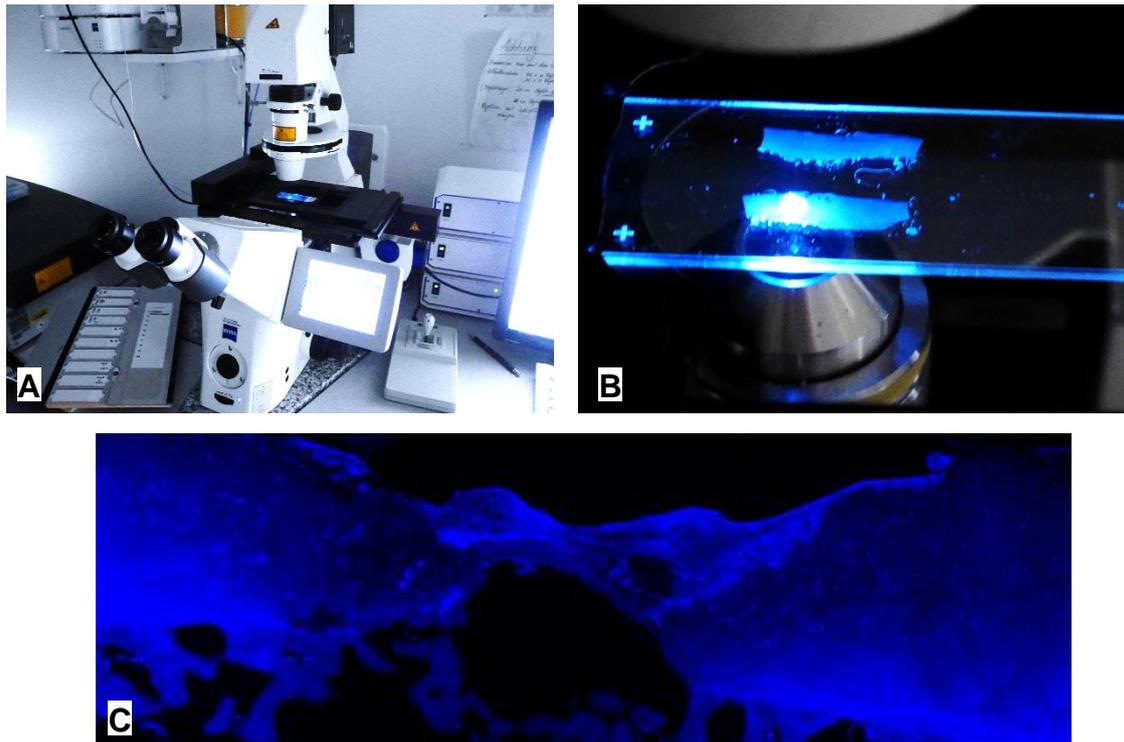


Abbildung 24: Erstellung von Mosaikbildern am LSM.

A: LSM 510 von Zeiss. B: Blau fluoreszierendes Kryotomschnitt-Präparat unter UV-Licht-Anregung. C: Ausschnitt eines aufgenommenen Mosaikbildes in blauer Fluoreszenz.

2.2.6 Auswertung der Knorpelschäden auf histologischer Ebene

Zur Auswertung werden die mikroskopischen Aufnahmen auf den zu untersuchenden Schaden analysiert. Der Schaden jedes Präparates wird in seiner Länge, Breite und Tiefe vermessen. Außerdem wird die Dicke des gesunden Knorpels neben dem Defekt bestimmt (Abbildung 25). Die Messung erfolgt mit Hilfe einer Skala in μm , welche von Axio Vision im Mikroskopie-Bild platziert werden kann. Entsprechend der gemessenen Parameter wird jedes Präparat nach ICRS- und Outerbridge-Klassifikation einem Grad an Knorpelschaden zugeteilt.

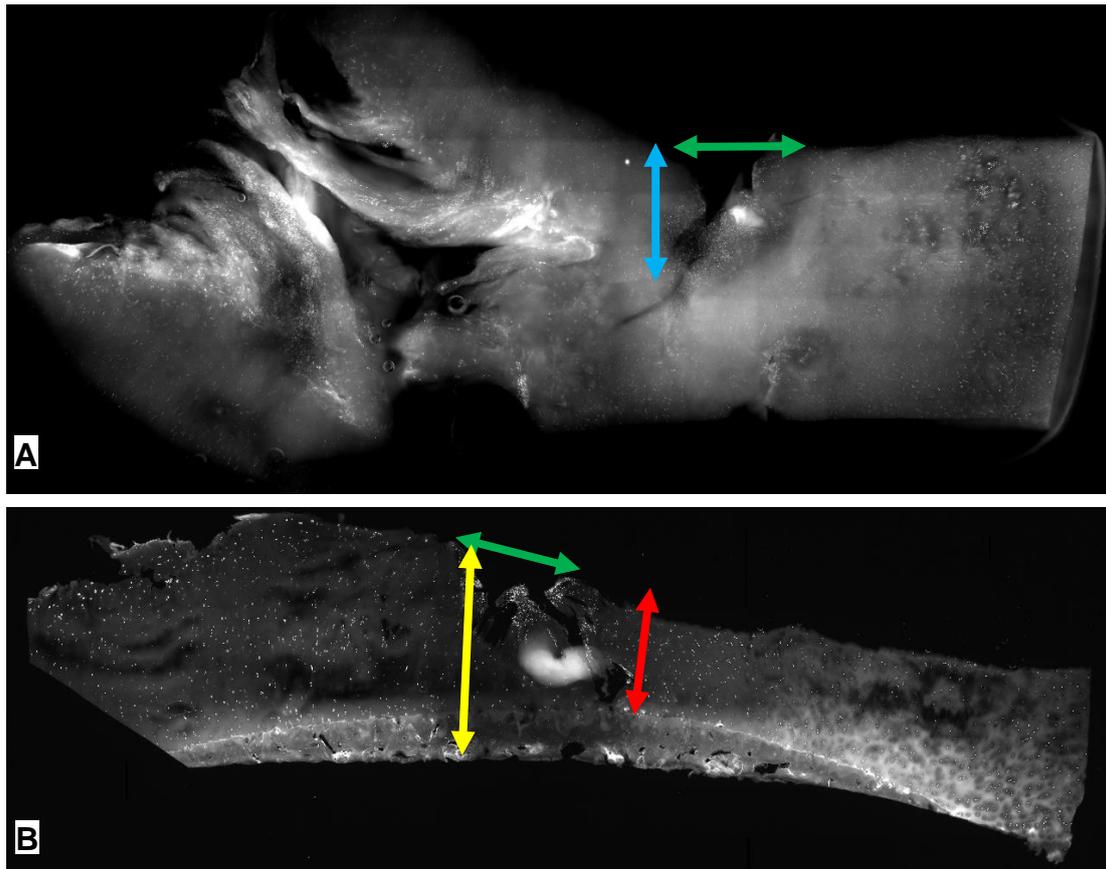


Abbildung 25: Vermessen der Knorpelschäden.

A: Vermessen der Länge (grün) und Breite (blau) an der Top-Down-Aufnahme des Knorpelschadens Nr. 9. B: Messen der Dicke des gesunden Knorpels (gelb), der Tiefe des Defekts (rot) und der Länge (grün) am Kryotomschnitt-Präparat (hier Knorpelschaden Nr. 9).

2.3 Statistische Methoden

Die folgenden statistischen Auswertungen werden mithilfe des Programms IBM SPSS Statistics (Version 8.0.1) durchgeführt. Das Signifikanzniveau wird bei $\alpha = 0,05$ festgelegt. Die Signifikanz wird asymptotisch berechnet.

2.3.1 Befundungsqualität

Die Beurteilung der Befundbarkeit diente der Klärung der Verwertbarkeit des Datensatzes beziehungsweise der einzelnen Programme, Lichtquellen und Filter. Bei unzureichender Befundung wird über den Ausschluss von Kanälen entschieden. Zur Beurteilung der Befundbarkeit werden alle Bilder unter Weiß- und UV-Licht sowie die Bilder mit künstlichem grünem Filter aller Observer aller Auswertungsrunden analysiert. Die Anzahl der Aufnahmen wird graphisch über

Material und Methoden

die gesamten Aufnahmen im Balkendiagramm nach Lichtquelle, Filter, Programm sowie differenziert nach Kanal veranschaulicht. Anschließend werden die Ergebnisse der Observer verglichen. Die graphische Darstellung pro Observer erfolgt im Balkendiagramm. Ein Chi-Quadrat-Test wird zwischen Befundungsqualität und Observern durchgeführt. Im Chi-Quadrat Test wird die zweiseitige Signifikanz sowie Cramer's V berechnet.

2.3.2 Objektivität

Um auszuschließen, dass die verwendete Lichtquelle den Beurteiler dazu verleitet, Knorpelschäden anders einzuteilen, wurden in der Auswertung alle Weißlicht-Aufnahmen gedoppelt und die zweite Version zur Imitation der UV-Bilder mit einem künstlichen grünen Filter versehen (2.1.7). Um die Objektivität der Beurteilung ultravioletter Aufnahmen zu prüfen, wird der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient zwischen den Outerbridge-Einteilungen der dritten Runde des zweiten Observers von Weißlicht-Bildern und Bildern mit künstlichem grünem Filter berechnet. Im Test wird die Signifikanz zweiseitig berechnet. Wenn eine hohe Korrelation zwischen der Originalversion der Bilder und derer mit künstlich grünem Filter besteht, geht man davon aus, dass UV-Bilder nicht subjektiv anders bewertet wurden als Weißlicht-Bilder und Objektivität gegeben ist.

2.3.3 Auswertung der Defekterkennung

Zur Auswertung der Defekterkennung wird die dritte Auswertungsrunde des zweiten Observers herangezogen. Es erfolgt die graphische Darstellung von Outerbridge und Fissuren pro Kanal im Balkendiagramm und von der Größe im Boxplot. Ein Kruskal-Wallis-Test wird berechnet, um zu überprüfen, ob sich die subjektive Einordnung von Aufnahmen nach Outerbridge sowie die Darstellung von Fissuren der einzelnen Kanäle unterscheidet. Bei signifikantem Ergebnis wird anschließend ein Mann-Whitney U post-hoc Test durchgeführt. Die Daten der Größe werden anhand des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung untersucht. Im Falle von Normalverteilung erfolgt eine one-way Anova mit post-hoc t-test für unabhängige Stichproben. Bei nicht-Normalverteilung wird ein Kruskal-Wallis-Test berechnet, um zu überprüfen, ob sich die ausgemessene

Material und Methoden

Größe der einzelnen Kanäle unterscheidet und bei signifikantem Ergebnis ein Mann-Whitney U post-hoc Test angeschlossen.

2.3.4 Vergleich Programm Standard / Chroma

In der Studie wurden die beiden Programme Standard und Chroma bei der Aufnahme von Knorpelschäden angewandt (2.1.3). Bei dem Programm „Chroma“ wird im Gegensatz zum Standard-Programm digital der Kontrast der Bilder verstärkt. Es soll ausgewertet werden, ob die Klassifikation nach Outerbridge des zweiten Observers in der dritten Runde unter Verwendung beider Programme korreliert. Der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient wird berechnet. Im Test wird die Signifikanz zweiseitig bestimmt.

2.3.5 Reliabilität

Die Auswertung der Interraterreliabilität der Arbeit erfolgt anhand der Ergebnisse der zweiten Auswertungsrunde aller Observer für Outerbridge, Größe und Fissuren im standardmäßig in der Arthroskopie verwendeten Kanal. Die Ergebnisse jedes Observers der zweiten Runde werden für Outerbridge und Fissuren im Balkendiagramm und für die Größe im Boxplot veranschaulicht. Für Outerbridge und Fissuren werden Kohen's Kappa sowie p zwischen Observer eins und zwei, eins und drei sowie zwei und drei berechnet. Die Interraterreliabilität der Größe wird mit dem Intraklassenkorrelationskoeffizienten (ICC) 3.1 bestimmt. Die Analyse erfolgt mit gemischten Zwei-Weg-Effekten (two way mixed) in justierter (consistency) und unjustierter (absolute agreement) Form.

Die Intraraterreliabilität wird getrennt bei jedem Observer für die ersten beiden Runden bestimmt. Die Ergebnisse jedes Observers der ersten und zweiten Runde werden für Outerbridge und Fissuren im Balkendiagramm und für die Größe im Boxplot veranschaulicht. Es wird jeweils Kohen's Kappa für Outerbridge und Fissuren und der ICC 3.1 two way mixed in consistency und absolute agreement für die Größe berechnet.

2.3.6 Vergleich mit histologischer Kontrolle

Es wird überprüft, in welchem Maß die Einschätzung in der Arthroskopie unter Standardbedingungen sowie unter Autofluoreszenz mit dem Kontrollergebnis übereinstimmt. Es erfolgt die graphische Darstellung der Outerbridge-Scores aus der ASK pro Kanal und der Histologie-Ergebnisse im Balkendiagramm. Für jeden in der Arthroskopie ermittelten Outerbridge-Score wird die Differenz zum histologisch ermittelten Grad desselben Defektes errechnet. Die absolute Differenz wird bestimmt. Die absolute Differenz wird pro Kanal im Balkendiagramm graphisch veranschaulicht. Ein Kruskal-Wallis-Test wird berechnet, um zu überprüfen, ob sich die Klassifikation nach Outerbridge der zwölf verschiedenen Kanäle und der histologischen Ergebnisse als 13. Kanal unterscheidet. Bei signifikantem Ergebnis wird ein Mann-Whitney U post-hoc Test angeschlossen.

3 Ergebnisse

3.1 Befundungsqualität

In der Arthroskopie wurden Bilder von neun Knorpelschäden an sieben Knien aufgenommen, wobei beim fünften und sechsten Knie jeweils zwei Schäden untersucht wurden. Die Aufnahmen wurden von drei Observern in drei Auswertungsrunden hinsichtlich Befundungsqualität, Defektgröße, Outerbridge und Fissuren beurteilt. Die subjektive Befundungsqualität der aufgenommenen Arthroskopiebilder aller Observer aller Auswertungsrunden unter allen Programmen, Lichtquellen und Filtern wurde ausgewertet. Beim AF-Filter wurden aufgrund eines Aufnahmefehlers insgesamt 108 Bilder weniger in die Analyse aufgenommen. Außerdem fehlt ein Wert des ALA-Filters des zweiten Observers in der dritten Auswertungsrunde. Die Mehrzahl der insgesamt ausgewerteten Bilder war adäquat (50,4 %) bis ausreichend (34,6 %) befundbar. 15 % der Bilder wurden als unzureichend befundbar eingestuft (Abbildung 26). Beim Vergleich der Programme Standard und Chroma zeigte sich, dass in der Standard-Einstellung 360 Bilder und in der Chroma-Einstellung 320 Bilder als adäquat befundbar bewertet wurden (Tabelle 4). Unter dem AF-Filter wurde die Befundung am häufigsten, nämlich bei 52,4 % der AF-Bilder als adäquat möglich eingestuft. Am wenigsten häufig wurden Aufnahmen unter dem W-Filter, bei 47,5 % der W-Bilder als adäquat befundbar bewertet (Abbildung 26). Unter Weißlicht und dem nachträglich eingeführten grünen Filter (künstlicher grüner Filter) schien die Verteilung hinsichtlich der Befundbarkeit deskriptiv weitgehend ähnlich. Unter Weißlicht war die Anzahl der Bilder in der Kategorie „adäquat zu befunden“ mit 73,3 % der Weißlicht-Bilder jedoch höher als bei den grün gefärbten Bildern (62,9 % der Bilder mit künstlichem grünem Filter). Von den Bildern unter UV-Licht stufen die Observer 65 Aufnahmen (14,5 %) als adäquat befundbar und 240 Aufnahmen (53,5 %) als ausreichend befundbar ein. 144 UV-Aufnahmen (32,1 %) waren unzureichend befundbar (Abbildung 26). Die Programm-Filter-Lichtquellen-Kombination (Kanal) Std/ W/ WL (Standard/ W/ Weißlicht) war am häufigsten, zu 75,3 % gut oder adäquat zu befunden, während der Kanal Std/ W/ UV am häufigsten, zu 43,2 % als unzureichend befundbar eingestuft wurde (Abbildung 27).

Ergebnisse

Befundungsqualität	Anzahl	% gesamt	gültige %
Adäquat	680	46,6	50,4
Ausreichend	467	32	34,6
unzureichend	202	13,9	15
fehlend	109	7,5	
gesamt	1458	100	100

Tabelle 4: Häufigkeiten Befundungsqualität.

Es wurde zwischen „Befundung adäquat möglich“, „Befundung ausreichend möglich“ und „Befundung unzureichend“ unterteilt.

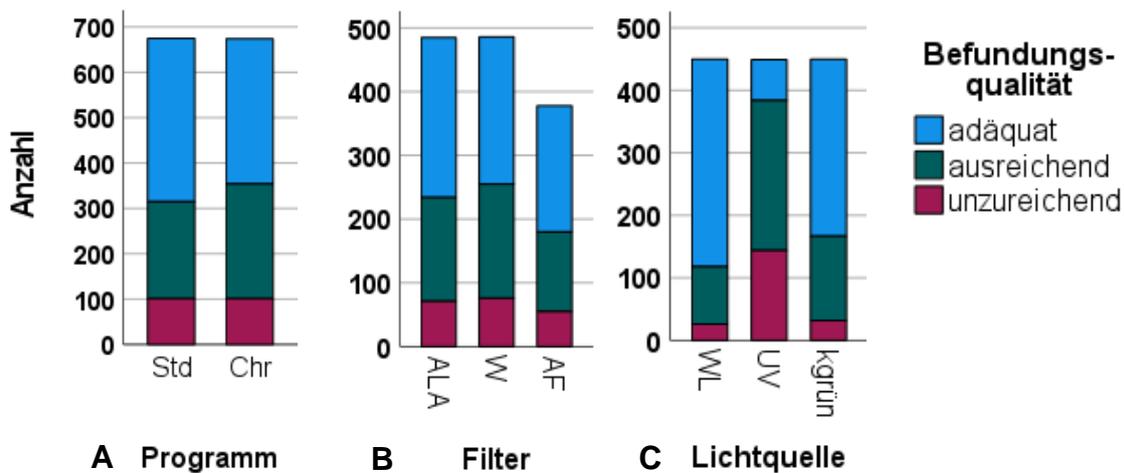


Abbildung 26: Anzahl befundeter Bilder nach Befundungsqualität.

A: Anzahl befundeter Bilder nach Lichtquelle. B: Anzahl befundeter Bilder nach Filter. C: Anzahl befundeter Bilder nach Programm.

Es wurde zwischen „Befundung adäquat möglich“, „Befundung ausreichend möglich“ und „Befundung unzureichend“ unterteilt. X-Achse: Darstellung nach Lichtquelle/ Filter/ Programm. Y-Achse: Anzahl der Bilder. Std: Standard. Chr: Chroma. ALA: ALA-Filter. W: W-Filter. AF: AF-Filter. WL: Weißlicht. UV: UV-Licht. Kgrün: künstlicher grüner Filter.

Ergebnisse

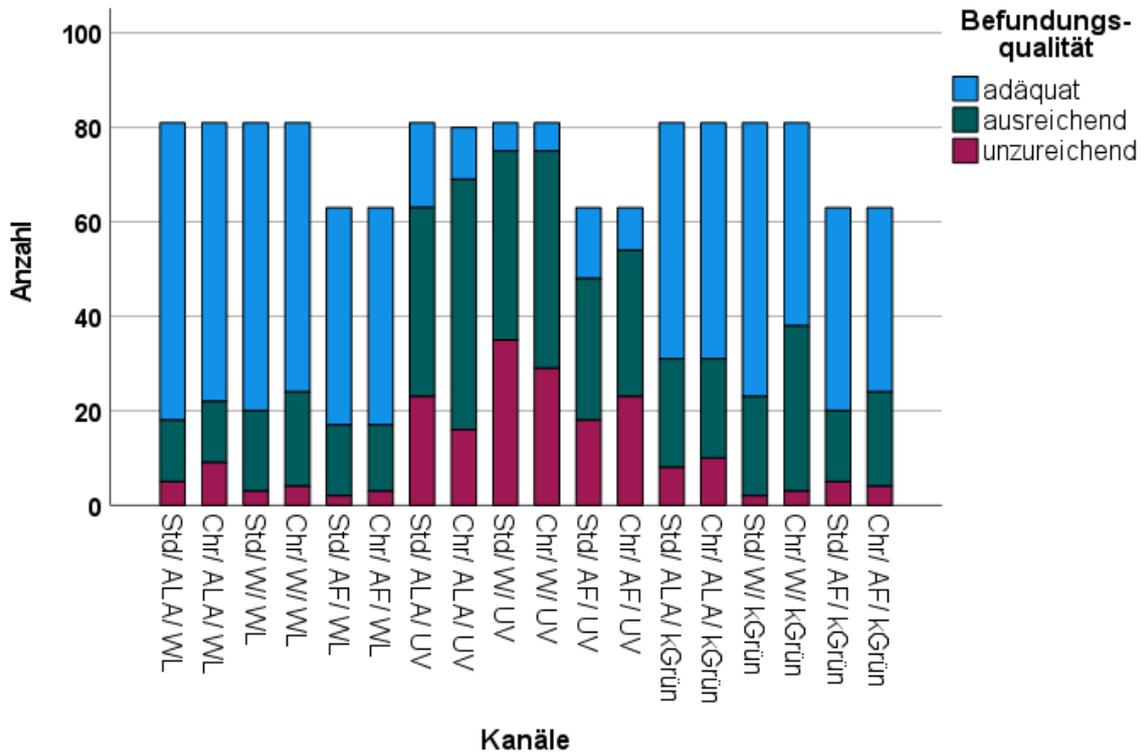


Abbildung 27: Anzahl befundeter Bilder nach Befundungsqualität pro Kanal. Es wurde zwischen „Befundung adäquat möglich“, „Befundung ausreichend möglich“ und „Befundung unzureichend“ unterteilt. X-Achse: Darstellung nach Kanälen. Y-Achse: Anzahl der Bilder. Std: Standard. Chr: Chroma. ALA: ALA-Filter. W: W-Filter. AF: AF-Filter. WL: Weißlicht. UV: UV-Licht. Kgrün: künstlicher grüner Filter.

Drei Observer befundeten über drei Auswertungsrunden insgesamt 1349 gültige Aufnahmen. Wenn man alle Auswertungsrunden getrennt für jeden Observer betrachtet, stufte der dritte Observer mit 67 % der Bilder häufiger Aufnahmen als adäquat befundbar ein als Observer eins und zwei. Observer zwei befundete die Aufnahmen in 95 Fällen als unzureichend befundbar und somit häufiger als die anderen beiden Observer (Abbildung 28). Beim Vergleich der Observer gab es keine erwarteten Zellhäufigkeiten kleiner als fünf. Es gab einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen zugewiesener Befundungsqualität und Observern, $\chi^2(4) = 90,636$; $p < 0,001$; $V = 0,18$. Trotz schlechter Befundungsqualität der Bilder unter UV-Licht wurde die statistische Auswertung der explorativen Studie weitergeführt. Jedoch werden Einschränkungen vorgenommen. Es wird analysiert, ob die Bilder mit künstlichem grünem Filter sowie die Bilder mit Choma-Programm ausgeschlossen werden können.

Ergebnisse

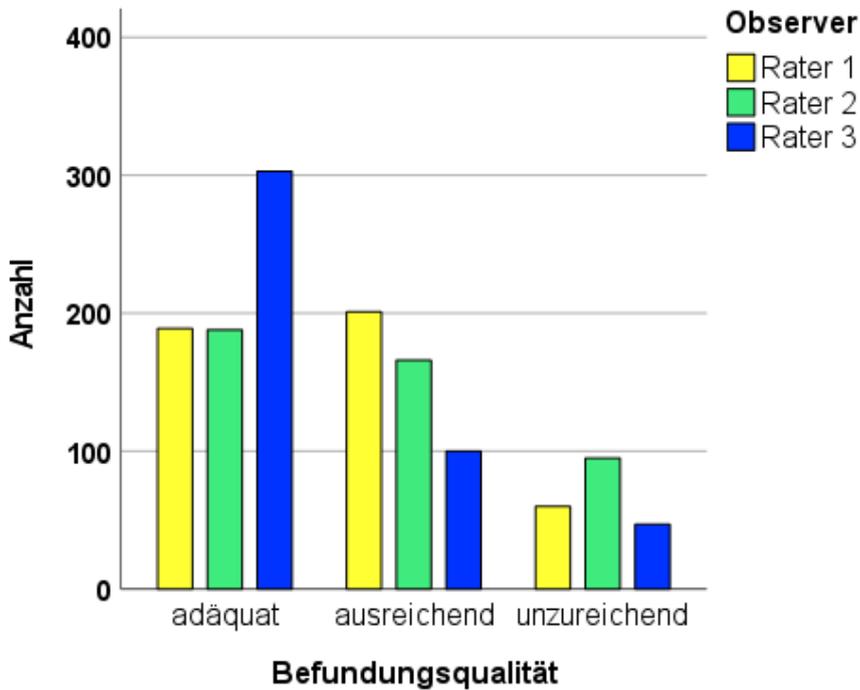


Abbildung 28: Anzahl befundeter Bilder nach Befundungsqualität pro Observer. Es wurde zwischen „Befundung adäquat möglich“, „Befundung ausreichend möglich“ und „Befundung unzureichend“ unterteilt. X-Achse: Darstellung nach Befundungsqualität. Y-Achse: Anzahl der Bilder.

3.1.1 Objektivität

Zur Prüfung der Objektivität wurde berechnet, ob die Daten der Klassifikation nach Outerbridge der ausgewerteten Bilder des zweiten Observers in der dritten Auswertungsrunde von Weißlicht-Bildern mit Bildern mit künstlichem grünem Filter korrelieren. Die Klassifizierungen unter Weißlicht und unter dem künstlichen grünen Filter korrelieren stark miteinander, Spearmans $\rho = 0,95$; $p < 0,001$. Folglich ist von einer relativ objektiven Auswertung der Autofluoreszenz-Bilder auszugehen. Da die Bilder mit künstlichem grünem Filter lediglich der Kontrolle der Objektivität galten, wurden sie bei der folgenden Auswertung nicht weiter berücksichtigt.

Outerbridge	Weißlicht	Künstlicher grüner Filter
Grad I	3	4
Grad II	28	25
Grad III	5	8
Grad IV	14	13
Gesamt	50	50

Ergebnisse

Tabelle 5: Anzahl befundeter Bilder nach Outerbridge unter Weißlicht und künstlichem grünem Filter.

Grad I: „intakte Oberfläche, Fibrillationen und/oder leichte Aufweichung“. Grad II: „Läsionstiefe < 50 % der Knorpeldicke (abnormaler Knorpel)“. Grad III: „Läsionstiefe > 50 % der Knorpeldicke, nicht bis zur kalzifizierenden Schicht“. Grad IV: „vollständiger Knorpelverlust (freiliegender subchondraler Knochen)“.

3.2 Auswertung der Defekterkennung

Zur Auswertung der klassifizierten Bilder nach Outerbridge, der Größe und der Darstellung von Knorpelfissuren wurde die dritte Auswertungsrunde des zweiten Observers herangezogen, da man nach dem gemeinsamen Auswerten in der dritten Runde von einer abgeglichenen Übereinstimmung zwischen den Observern ausgeht. Es wurden zwar insgesamt neun Knorpelschäden untersucht, jedoch entstanden aufgrund eines Aufnahmefehlers des AF-Filters beim zweiten und dritten Knorpelschaden statt 108 Aufnahmen nur 100 Aufnahmen pro Auswertungsrunde eines Observers.

3.2.1 Klassifikation nach Outerbridge

Die Aufnahmen wurden von Grad I bis IV nach Outerbridge eingeteilt. 51 % der ausgewerteten Aufnahmen stufte der dritte Observer als zweit-gradig ein, der Median lag bei Grad zwei. Mit 29 % stufte der Observer Grad-IV-Schäden als zweithäufigstes ein (Tabelle 6). Bei differenzierter Betrachtung der einzelnen Kanäle erkennt man, dass nur unter den Kanälen Std/ ALA/ WL, Std/ W/ WL, Std/ AF/ WL und Std/ AF/ UV ein Schaden als erst-gradig befundet wurde. Unter den Kanälen Chr/ ALA/ WL, Std/ ALA/ UV und Chr/ W/ WL befundete der Observer die meisten zweit-gradigen Schäden. Dritt-gradige Schäden wurden laut Observer vor allem unter Std/ W/ UV und Chr/ W/ UV gesehen. Viert-gradige Schäden wurden bei allen Kanälen in zwei bis drei Fällen befundet (Abbildung 29). Wenn man die Outerbridge Klassifikation eines Kanals unter Weiß- und UV-Licht vergleicht, fällt auf, dass alle Kanäle bis auf Std/ WL und Chr/ AF mehr eingeordnete Aufnahmen dritten und vierten Grades unter UV-Licht als unter Weißlicht aufweisen und weniger eingeordnete Aufnahmen ersten und zweiten Grades unter UV-Licht im Vergleich zum Weißlicht. Es gab keinen signifikanten

Ergebnisse

Unterschied zwischen den Outerbridge-Klassifizierungen zwischen den zwölf Kanälen, Kruskal-Wallis-H = 4,504; df = 11; p = 0,953.

Outerbridge	Anzahl Aufnahmen	% gesamt	Gültige %
Grad I	4	3,7	4
Grad II	51	47,2	51
Grad III	16	14,8	16
Grad IV	29	26,9	29
fehlend	8	7,4	100
Gesamt	108	100	

Tabelle 6: Häufigkeiten Outerbridge.

Grad I: „intakte Oberfläche, Fibrillationen und/oder leichte Aufweichung“. Grad II: „Läsionstiefe < 50 % der Knorpeldicke (abnormaler Knorpel)“. Grad III: „Läsionstiefe > 50 % der Knorpeldicke, nicht bis zur kalzifizierenden Schicht“. Grad IV: „vollständiger Knorpelverlust (freiliegender subchondraler Knochen)“.

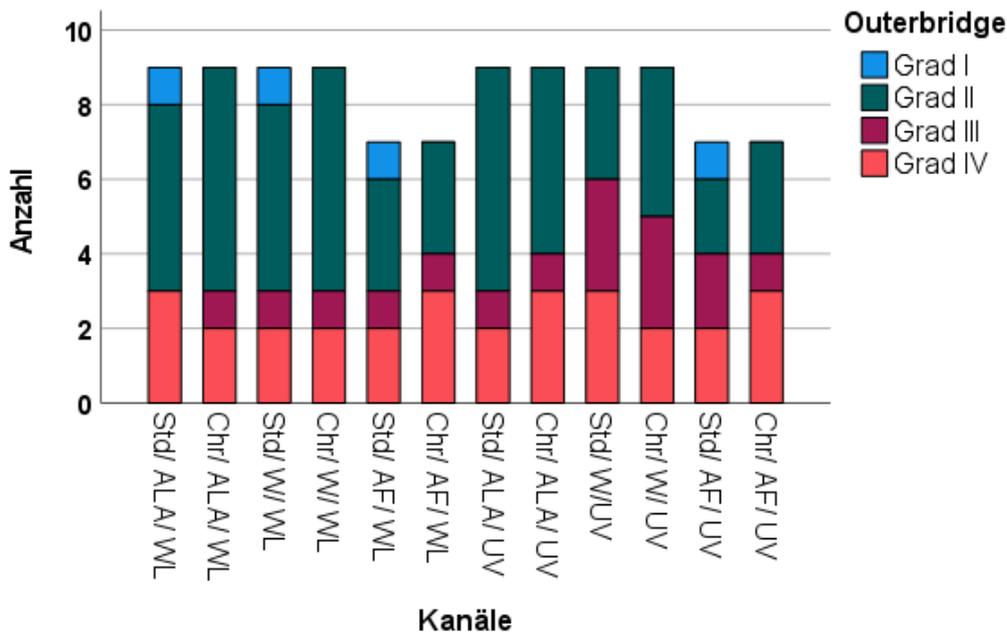


Abbildung 29: Anzahl befundeter Bilder nach Outerbridge-Klassifikation pro Kanal.

Grad I: „intakte Oberfläche, Fibrillationen und/oder leichte Aufweichung“. Grad II: „Läsionstiefe < 50 % der Knorpeldicke (abnormaler Knorpel)“. Grad III: „Läsionstiefe > 50 % der Knorpeldicke, nicht bis zur kalzifizierenden Schicht“. Grad IV: „vollständiger Knorpelverlust (freiliegender subchondraler Knochen)“. X-Achse: Darstellung nach Kanälen. Y-Achse: Anzahl der Bilder. Std: Standard. Chr: Chroma. ALA: ALA-Filter. W: W-Filter. AF: AF-Filter. WL: Weißlicht. UV: UV-Licht.

3.2.2 Fissuren

Die Aufnahmen wurden von „keine auslaufenden Fissuren“ bis „Nebenäste der Seitenäste der Hauptfissuren abgrenzbar“ eingeteilt. Mit 47 % der Bilder erkannte der zweite Observer am häufigsten keine auslaufenden Fissuren. Mit 39 % erkannte er am zweit-häufigsten abgrenzbare Hauptfissuren (Tabelle 7). Der Median lag bei abgrenzbaren Hauptfissuren. Die meisten Aufnahmen, in denen keine Fissuren erkannt wurden, fanden sich im Kanal Std/ ALA/ UV. Die meisten Hauptfissuren erkannte der Observer im Chr/ W/ UV-Kanal. Beim Vergleich einzelner Kanäle fällt auf, dass nur unter Kanälen mit Weißlicht Seitenäste der Hauptfissuren oder Nebenäste der Seitenäste der Hauptfissuren beobachtet wurden. Unter den UV-Licht-Kanälen beobachtete man entweder keine auslaufenden Fissuren oder Hauptfissuren (Abbildung 30). Es gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen Fissuren zwischen Kanälen, Kruskal-Wallis-H = 13,625; df = 11; p = 0,254. Ein histologischer Vergleich mit den tatsächlichen Fissuren sowie eine Aussage hinsichtlich der Genauigkeit der Beurteilung waren methodenbedingt nicht möglich.

Fissuren	Anzahl	% gesamt	Gültige %
Keine auslaufenden Fissuren	47	43,5	47
Hauptfissuren abgrenzbar	39	36,1	39
Seitenäste der Hauptfissuren abgrenzbar	8	7,4	8
Nebenäste der Seitenäste der Hauptfissuren abgrenzbar	6	5,6	6
fehlend	8	7,4	100
Gesamt	108	100	

Tabelle 7: Häufigkeiten Fissuren.

Ergebnisse

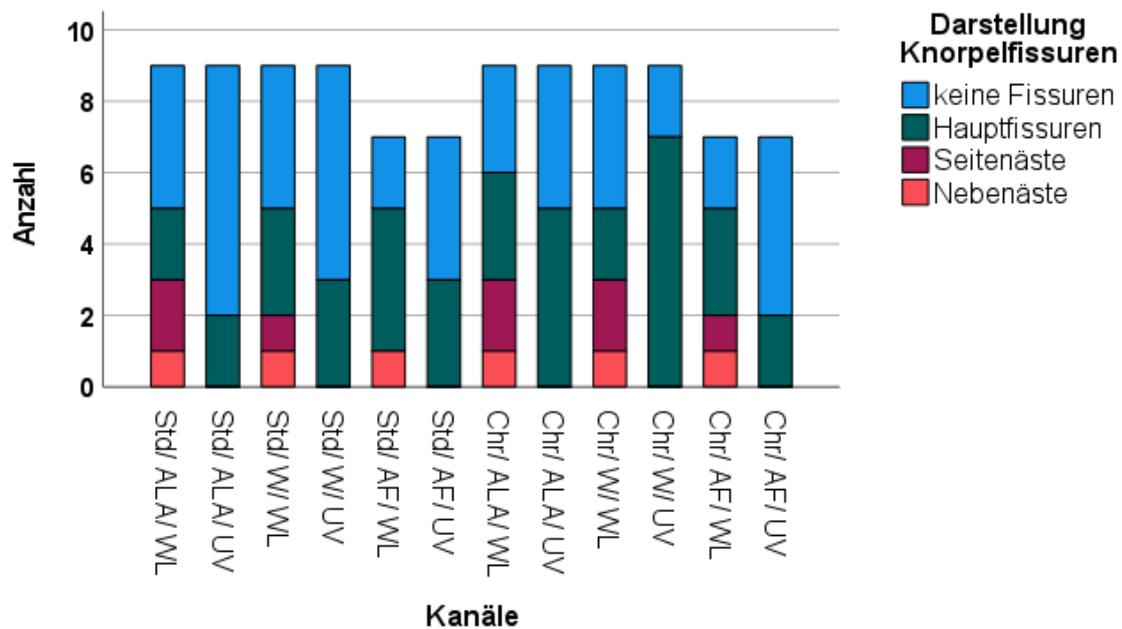


Abbildung 30: Anzahl befundeter Bilder nach Fissuren pro Kanal.

Es wurde zwischen „keine auslaufenden Fissuren“, „Hauptfissuren abgrenzbar“ und „Seitenäste der Hauptfissuren abgrenzbar“ und „Nebenäste der Seitenäste der Hauptfissuren abgrenzbar“ unterteilt. X-Achse: Darstellung nach Kanälen. Y-Achse: Anzahl der Bilder. Std: Standard. Chr: Chroma. ALA: ALA-Filter. W: W-Filter. AF: AF-Filter. WL: Weißlicht. UV: UV-Licht.

3.2.3 Größe

Die Knorpelschäden der aufgenommenen Bilder wurden am Computer in Pixeln in Länge und Breite ausgemessen und zur Fläche multipliziert. Die Fläche der Knorpeldefekte war nicht normalverteilt ($p < 0,01$). Der Median der Größe über 100 Defekte lag bei 76791 Pixeln² (Tabelle 8). Im Median befundete der zweite Observer unter dem Kanal Chr/ W/ UV Knorpelschäden am größten mit einer Fläche von 121034 Pixeln² und am kleinsten unter Chr /AF/ UV mit einem Median von 49203 Pixeln². Beim Vergleich von Kanälen unter verschiedenen Lichtquellen fällt auf, dass außer unter den Kanälen Std/ ALA und Chr/ AF der Median der Größe unter UV-Licht stets größer ist als unter Weißlicht. Die größte Streubreite weist der Chr/ W/ UV- Kanal auf (Abbildung 31). Es gab keinen signifikanten Unterschied der Größe zwischen Kanälen, Kruskal-Wallis-H = 1,549; df = 11; p = 1,00. Das Ausmessen der Größe am Computer in mm² oder ein histologischer Vergleich mit der tatsächlichen Größe der Knorpelschäden waren methodenbedingt nicht möglich.

Ergebnisse

Größe Knorpelschäden	Größe in Pixel ²
Median	76791
Minimum	15575
Maximum	243718
Spannweite	228143

Tabelle 8: Datenanalyse der Größe.

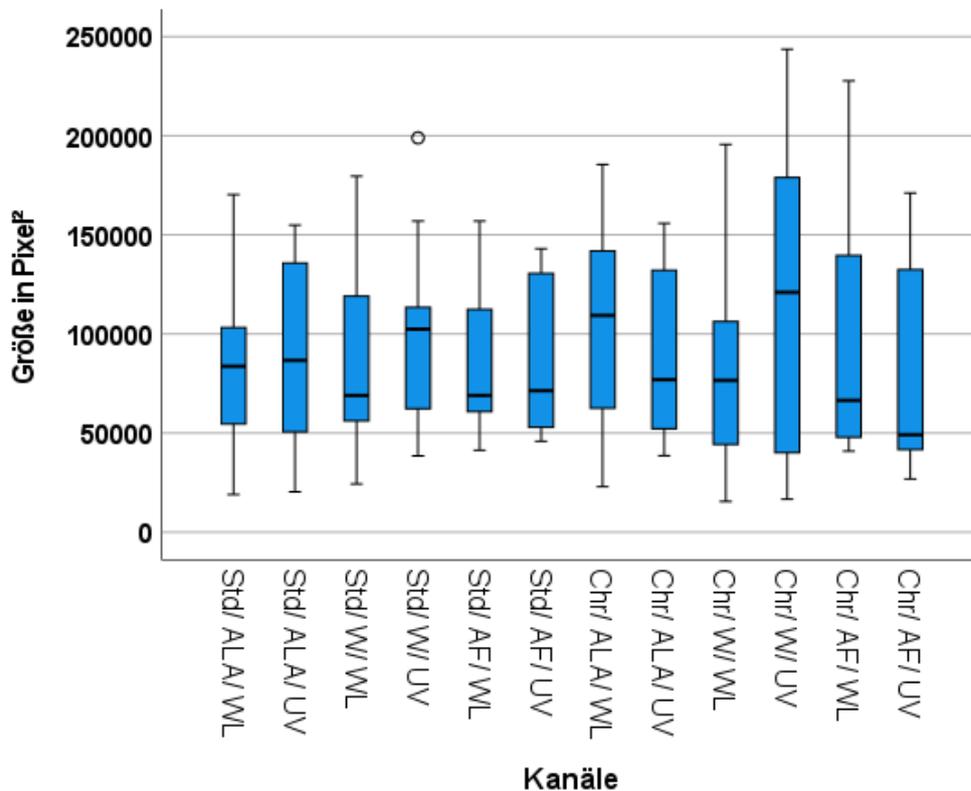


Abbildung 31: Median befundeter Bilder nach Größe in Pixel² pro Kanal. Querstrich: Median. Box: Interquartilenabstand. Antennen: Minimum/Maximum (ausgenommen Ausreißer: durch Kreis gekennzeichnet). X-Achse: Darstellung nach Kanälen. Y-Achse: Median der Größe in Pixel². Std: Standard. Chr: Chroma. ALA: ALA-Filter. W: W-Filter. AF: AF-Filter. WL: Weißlicht. UV: UV-Licht.

3.2.4 Vergleich Programm Standard / Chroma

In der Auswertung wurde analysiert, ob die Daten der Befundung unter den Programmen Standard und Chroma korrelieren. Zur Auswertung wurden die Daten der Klassifikation nach Outerbridge in der dritten Auswertungsrunde des zweiten Observers zwischen dem Standard- und Chroma-Programm verglichen. Unter dem Chroma-Programm wurden im Gegensatz zur Standard-Einstellung keine Aufnahme als erst-gradig eingestuft. Dafür ordnete der Rater im Standard-Programm weniger zweit-gradige Schäden ein (Tabelle 9). Die Klassifizierungen

Ergebnisse

der Programme korrelierten stark miteinander, Spearmans $\rho = 0,88$, $p < 0,001$. Aufgrund dieser Schlussfolgerung wurden Bilder des Chroma-Programms in der folgenden Analyse nicht weiter berücksichtigt.

Outerbridge	Standard	Chroma
Grad I	4	0
Grad II	24	27
Grad III	8	8
Grad IV	14	15
Gesamt	50	50

Tabelle 9: Anzahl befundeter Bilder nach Outerbridge unter Standard- und Chroma-Programm.

Grad I: „intakte Oberfläche, Fibrillationen und/oder leichte Aufweichung“. Grad II: „Läsionstiefe $< 50\%$ der Knorpeldicke (abnormaler Knorpel)“. Grad III: „Läsionstiefe $> 50\%$ der Knorpeldicke, nicht bis zur kalzifizierenden Schicht“. Grad IV: „vollständiger Knorpelverlust (freiliegender subchondraler Knochen)“.

3.3 Reliabilität

Die arthroskopischen Aufnahmen wurden von drei Observern in drei Auswertungsrunden hinsichtlich Defektgröße, Outerbridge und Darstellung von Fissuren beurteilt. Um die Reliabilität zu untersuchen, wurden die Daten des standardmäßig in der Arthroskopie verwendeten Kanals (Std/ W/ Weißlicht) verwendet. Für sämtliche Arthroskopie-Bilder des Standard-Kanals lag zu jedem Zeitpunkt von jedem Observer ein vollständiger Datensatz vor.

3.3.1 Interraterreliabilität

Die Interraterreliabilität zwischen drei Observern wurde in der zweiten Auswertungsrunde für Größe, Outerbridge und Fissuren analysiert. Im Standard-Kanal ergeben sich in der zweiten Runde neun Aufnahmen pro Observer (Rater). Alle Aufnahmen wurden von allen Observern ausgewertet. Die Rater wurden nicht zufällig ausgewählt. Bei Betrachtung der Outerbridge-Klassifikation des Standard-Kanals der Rater fällt auf, dass der zweite Observer in der zweiten Runde als einziger keine Schäden dritten Grades klassifizierte und der dritte Observer keine Schäden vierten Grades (Abbildung 32). Für Outerbridge und Fissuren wurde Kohen's Kappa zwischen den Auswertungsergebnissen der

Ergebnisse

zweiten Runde von Observer eins und zwei, eins und drei sowie zwei und drei berechnet. Die Daten der Outerbridge-Klassifikation stimmten laut Grenzen von Landis und Koch mäßig bis substanziell überein, $0,237 \leq \kappa \leq 0,695$. Die größte Übereinstimmung wiesen die Ergebnisse von Observer eins und zwei auf (Tabelle 10).

Beim Vergleich der Rater bezüglich der Darstellung von Knorpelfissuren kann man erkennen, dass der erste Rater als einziger keine Aufnahme der Kategorie „keine auslaufenden Fissuren“ zuordnete. Außerdem sah er bei doppelt so vielen Aufnahmen Hauptfissuren wie die anderen Rater (Abbildung 33). Die Fissuren stimmten mäßig bis substanziell überein, $0,224 \leq \kappa \leq 0,684$. Die größte Übereinstimmung war zwischen Observer zwei und drei zu finden (Tabelle 10).

Die Größe der Knorpelschäden unter dem Standard-Kanal wurde im Median vom zweiten Rater am kleinsten bewertet und vom dritten Rater am größten. Die Werte des dritten Raters wiesen außerdem den größten Interquartilsabstand auf (Abbildung 34).

Die Werte der Observer stimmten laut Cicchetti gut, ICC (3.1) = 0,731, bis sehr gut überein, ICC (3.1) = 0,823 (Tabelle 11).

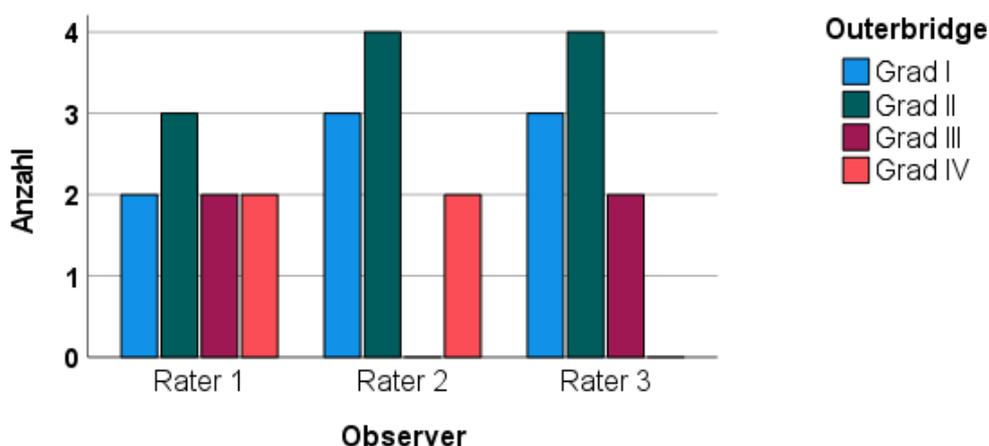


Abbildung 32: Anzahl befundeter Bilder nach Outerbridge pro Observer. Grad I: „intakte Oberfläche, Fibrillationen und/oder leichte Aufweichung“. Grad II: „Läsionstiefe < 50 % der Knorpeldicke (abnormaler Knorpel)“. Grad III: „Läsionstiefe > 50 % der Knorpeldicke, nicht bis zur kalzifizierenden Schicht“. Grad IV: „vollständiger Knorpelverlust (freiliegender subchondraler Knochen)“. X-Achse: Darstellung Observer. Y-Achse: Anzahl der Bilder.

Ergebnisse

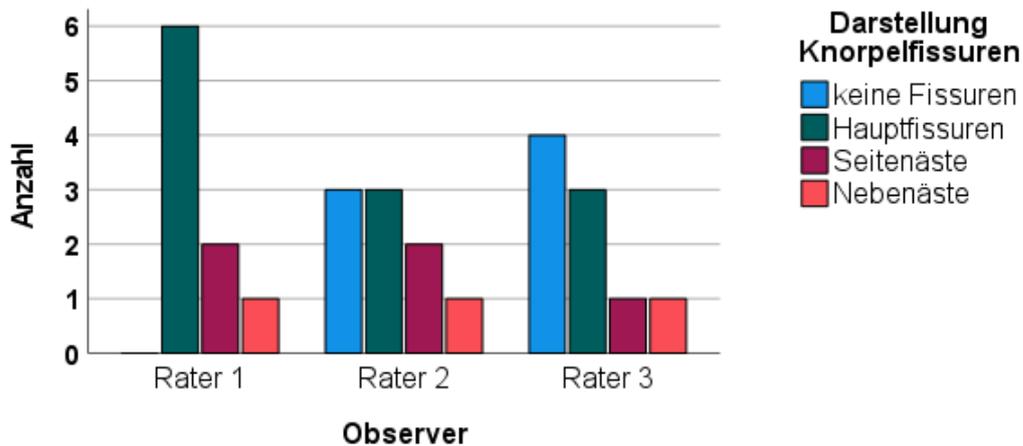


Abbildung 33: Anzahl befundeter Bilder nach Fissuren pro Observer. Es wurde zwischen „keine auslaufenden Fissuren“, „Hauptfissuren abgrenzbar“ und „Seitenäste der Hauptfissuren abgrenzbar“ und „Nebenäste der Seitenäste der Hauptfissuren abgrenzbar“ unterteilt. X-Achse: Darstellung Observer. Y-Achse: Anzahl der Bilder.

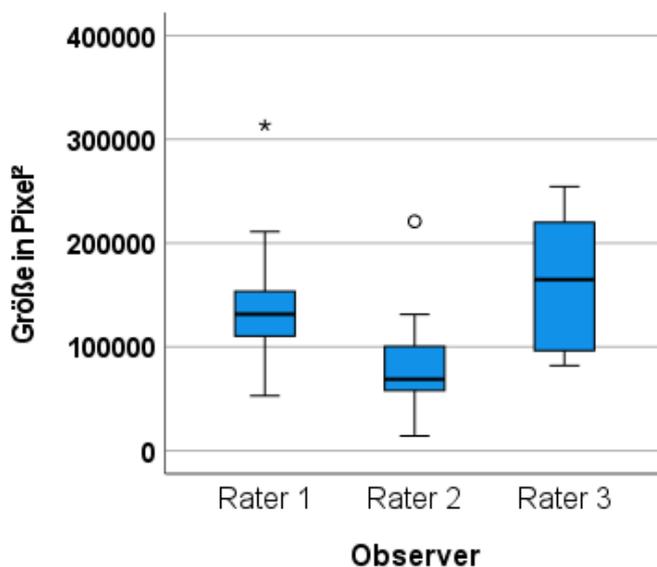


Abbildung 34: Median befundeter Bilder nach Größe in Pixel² pro Observer. Querstrich: Median. Box: Interquartilenabstand. Antennen: Minimum/Maximum (ausgenommen Ausreißer: durch Kreis gekennzeichnet). X-Achse: Darstellung nach Observer. Y-Achse: Median der Größe in Pixel².

Runde 2	Observer 1/ 2	Observer 1/ 3	Observer 2/ 3
Outerbridge	$\kappa = 0,695$; $p < 0,001$	$\kappa = 0,237$; $p = 0,205$	$\kappa = 0,357$; $p = 0,059$
Fissuren	$\kappa = 0,224$; $p = 0,16$	$\kappa = 0,25$; $p = 0,069$	$\kappa = 0,684$; $p = 0,001$

Tabelle 10: Interraterreliabilität Outerbridge und Fissuren zwischen drei Observern in Runde zwei.

κ : Kohen's Kappa. p : Wahrscheinlichkeit.

Ergebnisse

Runde 2	Observer 1-3
Größe – absolute agreement	ICC (3.1) = 0,731; p = 0,002
Größe – consistency	ICC (3.1) = 0,823; p = 0,002

Tabelle 11: Interraterreliabilität der Größe zwischen drei Observern in Runde zwei.

ICC: Intraklassenkorrelationskoeffizient. p: Wahrscheinlichkeit.

3.3.2 Intraraterreliabilität

Für die Analyse der Intraterreliabilität wurden die Daten der ersten und zweiten Auswertungsrunde im Standardkanal (Std/ W/ Weißlicht) ausgewertet. Die Intraraterreliabilität wurde für jeden Observer getrennt zwischen der ersten und zweiten Auswertungsrunde bezüglich Größe, Outerbridge und Fissuren untersucht. Alle Aufnahmen wurden von allen Observern ausgewertet. Die Rater wurden nicht zufällig ausgewählt. Bei den Daten der Klassifikation nach Outerbridge fällt beim zweiten Observer auf, dass er in der ersten Runde drei Schäden dritten Grades und keine viert-gradigen Schäden einordnete, während er in der zweiten Runde nur viert- und keine dritt-gradigen Schäden erkannte (Abbildung 35). Die Daten für Outerbridge stimmten moderat bis substantiell überein, $0,55 \leq \kappa \leq 0,66$ (Tabelle 12).

Bei den Fissuren ordnete der erste Observer nur in der ersten Runde Schäden ohne auslaufende Fissuren ein. Seitenäste der Hauptfissuren erkannte er hingegen nur in der zweiten Auswertungsrunde. Der dritte Observer erfasste nur in der zweiten Runde Nebenäste der Seitenäste der Hauptfissuren (Abbildung 36). Die Korrelation der Darstellung von Fissuren war gering bei Observer eins bis fast perfekt bei Observer drei, $0,1 \leq \kappa \leq 0,833$ (Tabelle 12).

Der Median der ausgemessenen Größe der Knorpelschäden war bei allen drei Ratern in der zweiten Auswertungsrunde kleiner als in der ersten (Abbildung 37). Die Übereinstimmung war sehr gut, $0,782 \leq ICC \leq 0,966$, wobei Observer zwei die höchste Übereinstimmung aufwies und Observer drei die niedrigste (Tabelle 12).

Ergebnisse

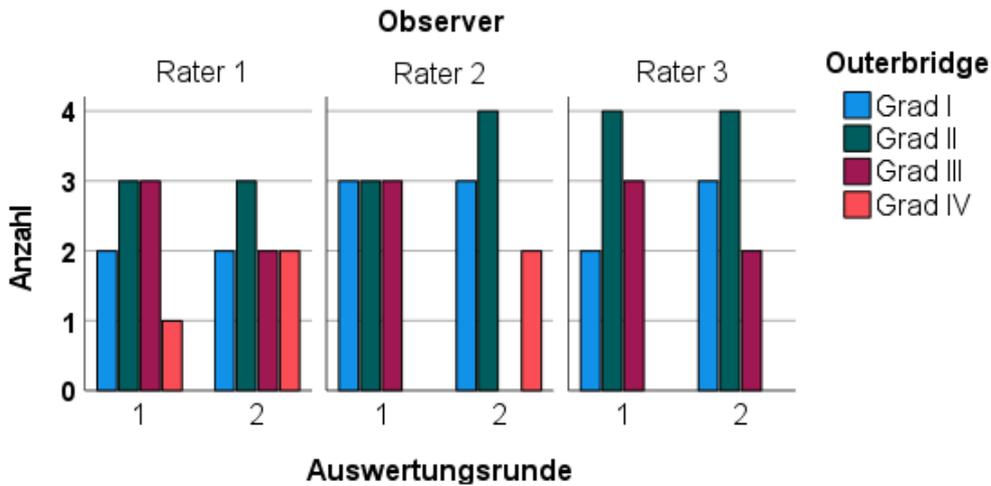


Abbildung 35: Anzahl befundeter Bilder nach Outerbridge pro Observer über zwei Runden.

Grad I: „intakte Oberfläche, Fibrillationen und/oder leichte Aufweichung“. Grad II: „Läsionstiefe < 50 % der Knorpeldicke (abnormaler Knorpel)“. Grad III: „Läsionstiefe > 50 % der Knorpeldicke, nicht bis zur kalzifizierenden Schicht“. Grad IV: „vollständiger Knorpelverlust (freiliegender subchondraler Knochen)“. 1: erste Auswertungsrunde. 2: zweite Auswertungsrunde. X-Achse: Darstellung nach Auswertungsrunde. Y-Achse: Anzahl der Bilder.

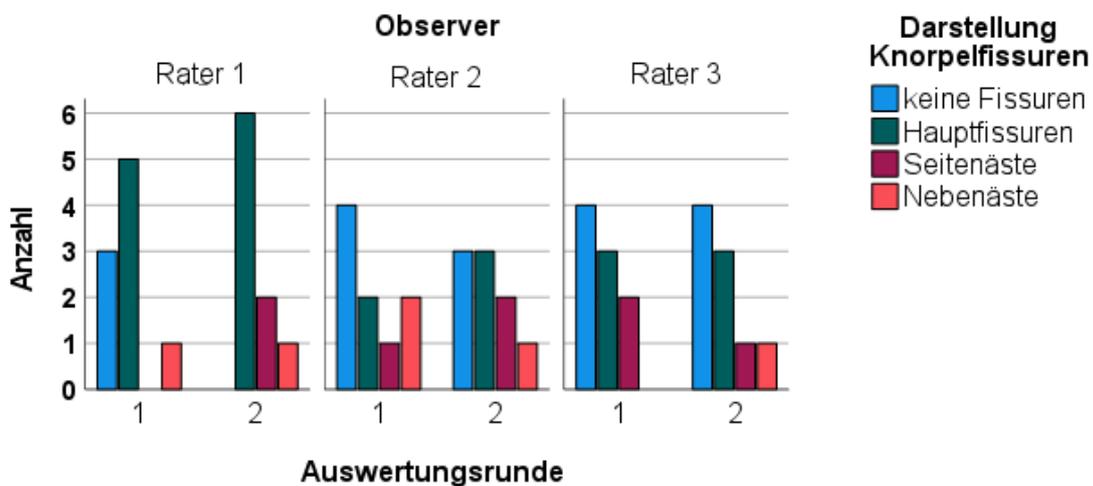


Abbildung 36: Anzahl befundeter Bilder nach Fissuren pro Observer über zwei Runden.

Es wurde zwischen „keine auslaufenden Fissuren“, „Hauptfissuren abgrenzbar“ und „Seitenäste der Hauptfissuren abgrenzbar“ und „Nebenäste der Seitenäste der Hauptfissuren abgrenzbar“ unterteilt. 1: erste Auswertungsrunde. 2: zweite Auswertungsrunde. X-Achse: Darstellung nach Auswertungsrunde. Y-Achse: Anzahl der Bilder.

Ergebnisse

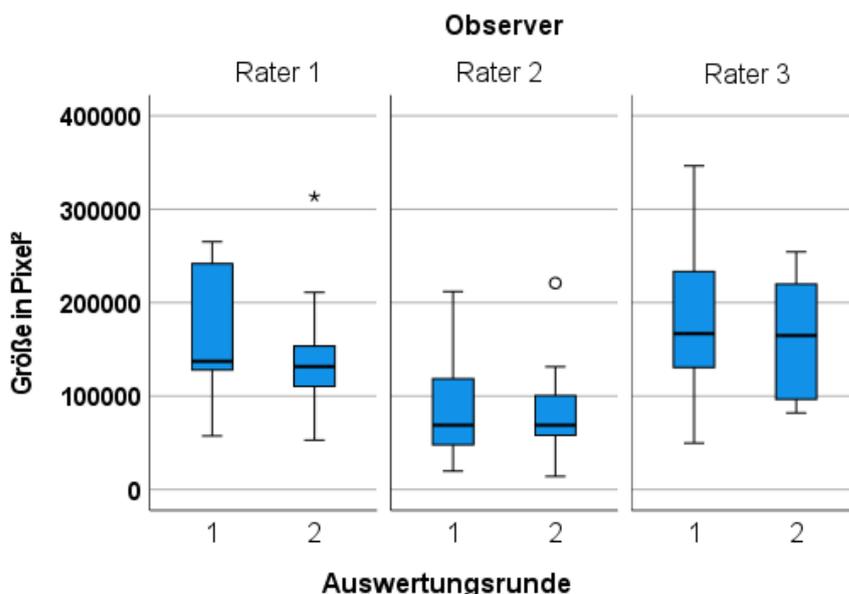


Abbildung 37: Median befundeter Bilder nach Größe in Pixel² pro Observer über zwei Runden.

Querstrich: Median. Box: Interquartilenabstand. Antennen: Minimum/Maximum (ausgenommen Ausreißer: durch Kreis gekennzeichnet). 1: erste Auswertungsrunde. 2: zweite Auswertungsrunde. X-Achse: Darstellung nach Auswertungsrunde. Y-Achse: Median der Größe in Pixel².

Intrarater Runde 1/ 2	Observer 1	Observer 2	Observer 3
Outerbridge	$\kappa = 0,55$; $p = 0,004$	$\kappa = 0,55$; $p = 0,001$	$\kappa = 0,66$; $p = 0,004$
Fissuren	$\kappa = 0,1$; $p = 0,495$	$\kappa = 0,39$; $p = 0,04$	$\kappa = 0,833$; $p < 0,001$
Größe - absolute agreement	ICC (3.1) = 0,896; $p = 0,002$	ICC (3.1) = 0,966; $p < 0,001$	ICC (3.1) = 0,782; $p = 0,024$
Größe - consistency	ICC (3.1) = 0,895; $p = 0,002$	ICC (3.1) = 0,962; $p < 0,001$	ICC (3.1) = 0,779; $p = 0,024$

Tabelle 12: Intraraterreliabilität Outerbridge, Fissuren und Größe zwischen drei Observern in Runde zwei

ICC: Intraklassenkorrelationskoeffizient. κ : Kohen's Kappa. p : Wahrscheinlichkeit.

3.4 Vergleich mit histologischer Kontrolle

Ziel der Studie war es, herauszufinden, ob eine UV-Lichtquelle Vorteile bei der Klassifikation nach Outerbridge im Vergleich zu Weißlicht erbringen kann. Dazu wurden die neun Knorpelschäden auf histologischer Ebene ausgemessen und

Ergebnisse

nach Outerbridge klassifiziert. Es zeigte sich, dass jeweils ein Drittel der Knorpelschäden Grad II sowie ein Drittel Grad IV aufwiesen. Zwei weitere Schäden waren dritt-gradig und einer erst-gradig (Tabelle 13).

Outerbridge histologische Kontrolle	Anzahl	% Gesamt
Grad I	1	11,1
Grad II	3	33,3
Grad III	2	22,2
Grad IV	3	33,3
Gesamt	9	100

Tabelle 13: Häufigkeiten Outerbridge histologische Kontrolle.

Grad I: „intakte Oberfläche, Fibrillationen und/oder leichte Aufweichung“. Grad II: „Läsionstiefe < 50 % der Knorpeldicke (abnormaler Knorpel)“. Grad III: „Läsionstiefe > 50 % der Knorpeldicke, nicht bis zur kalzifizierenden Schicht“. Grad IV: „vollständiger Knorpelverlust (freiliegender subchondraler Knochen)“.

Ergebnisse

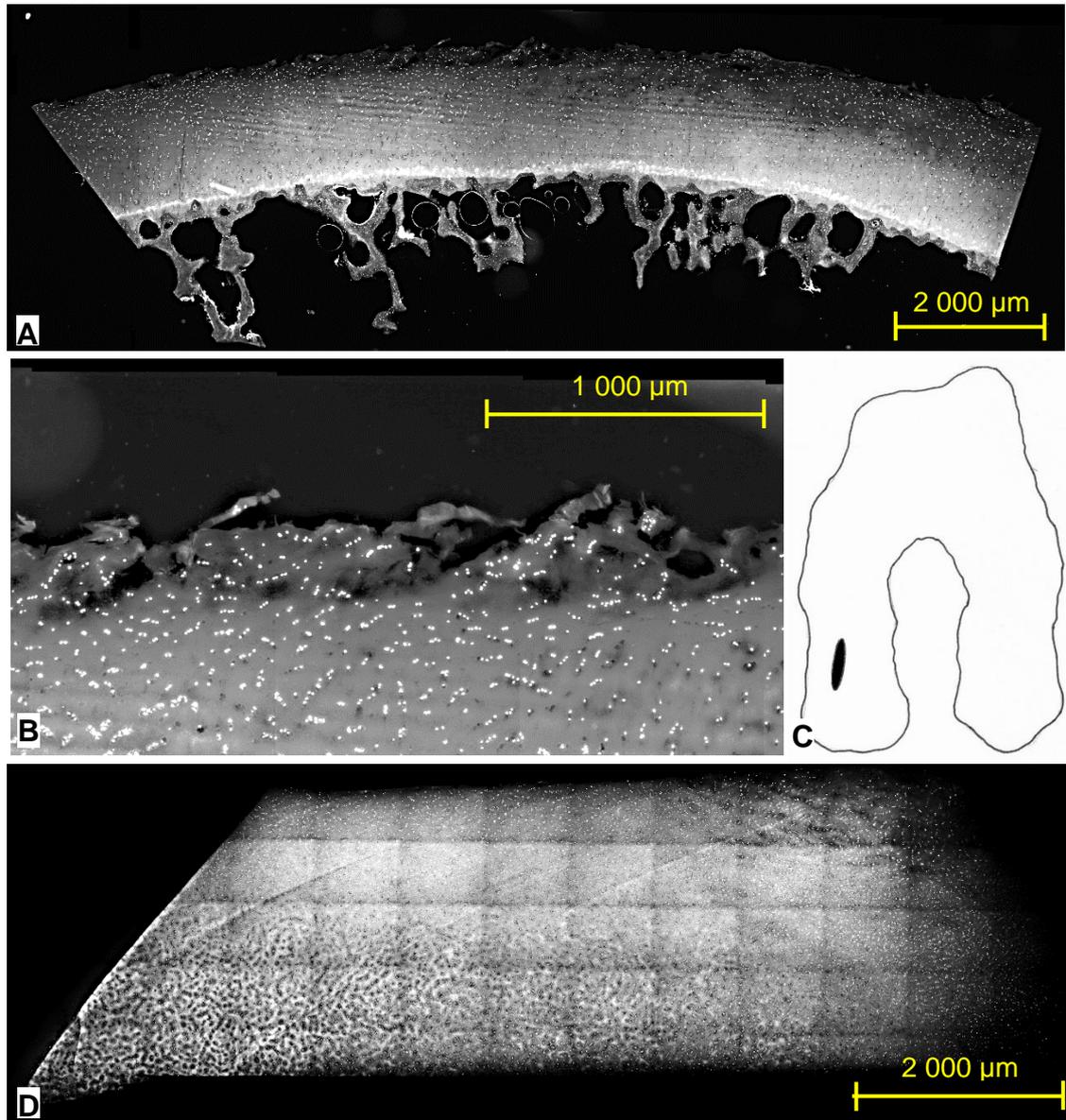


Abbildung 38: Knorpelschaden Nr. 5 histologisch, Grad I.

A: Übersichtsaufnahme im Querschnitt, aufgenommen in 100-facher Vergrößerung. Der Schaden wurde in der Histologie als erst-gradig nach Outerbridge klassifiziert. Unten im Bild sieht man Knochen trabekel, oben den Knorpel. Die Zellkerne der Chondrozyten sind aufgrund der DAPI-Färbung im Bild weiß. B: Vergrößerter Ausschnitt der Knorpeloberfläche von A mit oberflächlichen Fibrillierungen aber intakter Knorpeldicke. C: Lokalisation des Schadens in der Schablone. D: Top-Down-Aufnahme, aufgenommen in 100-facher Vergrößerung.

Kanal	Out	Kanal	Out	Kanal	Out
ALA/WL	I	W/ WL	I	AF/ WL	I
ALA/UV	II	W/ UV	II	AF/ UV	I
Histologie	I				

Ergebnisse

Tabelle 14: Knorpelschaden Nr. 5. Ergebnisse der Outerbridge-Klassifizierung pro Kanal.

Grad I: „intakte Oberfläche, Fibrillationen und/oder leichte Aufweichung“. Grad II: „Läsionstiefe < 50 % der Knorpeldicke (abnormaler Knorpel)“. Grad III: „Läsionstiefe > 50 % der Knorpeldicke, nicht bis zur kalzifizierenden Schicht“. Grad IV: „vollständiger Knorpelverlust (freiliegender subchondraler Knochen)“.
Out: Outerbridge. ALA: ALA-Filter. W: W-Filter. AF: AF-Filter. WL: Weißlicht. UV: UV-Licht.

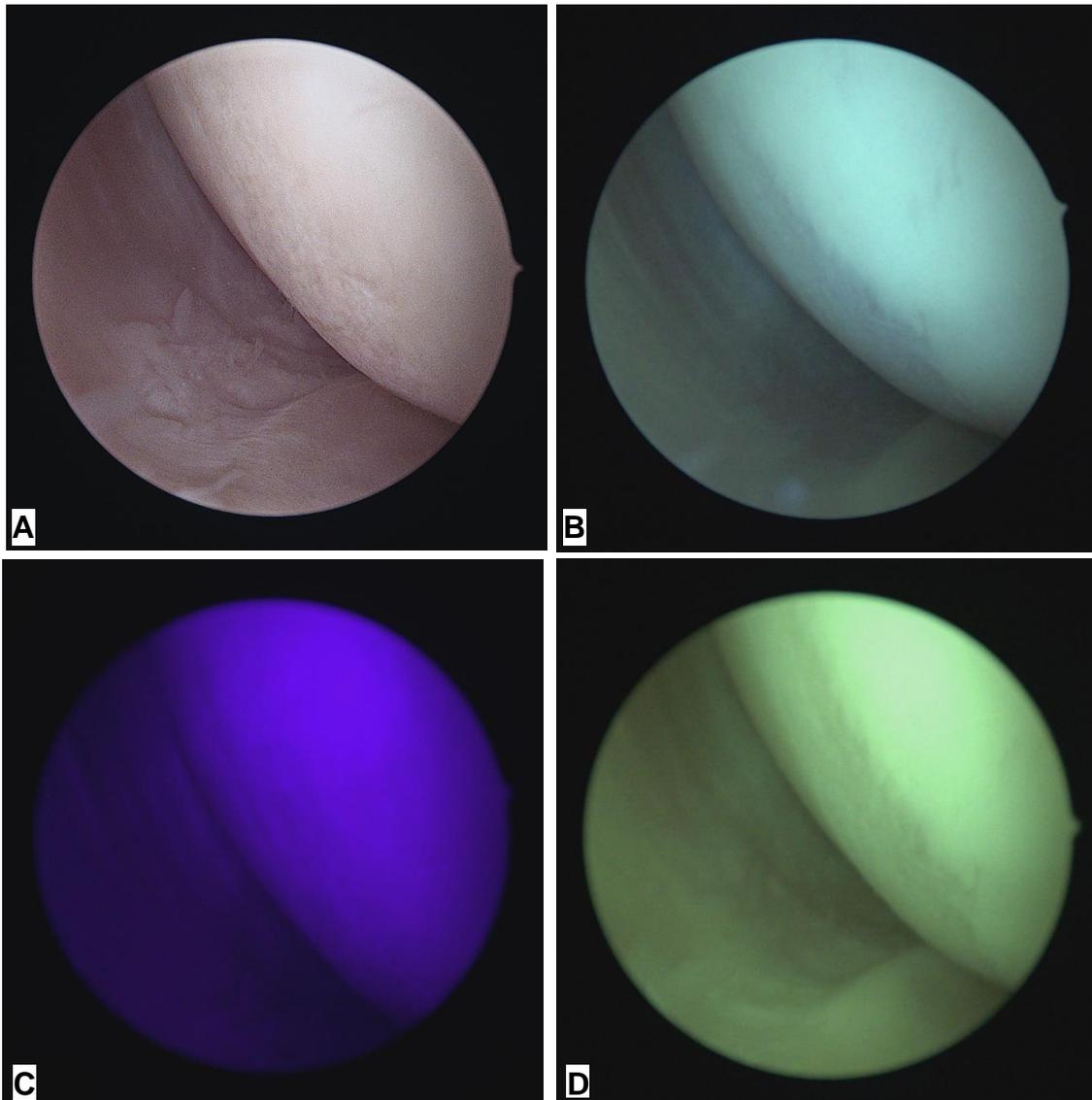


Abbildung 39: Knorpelschaden Nr. 5 arthroskopisch (histologisch Grad I).
A: Arthroskopische Aufnahme im Standard-Kanal (W/ WL), erst-gradig nach Outerbridge klassifiziert. B: Arthroskopische Aufnahme im ALA/ UV-Kanal, zweit-gradig klassifiziert. C: Arthroskopische Aufnahme im W/ UV-Kanal, zweit-gradig klassifiziert. D: Arthroskopische Aufnahme im AF/ UV-Kanal, erst-gradig klassifiziert. A und D wurden richtig eingestuft, B und C falsch zu hoch. Die Abbildung bezieht sich auf Abbildung 38, Tabelle 14.
ALA: ALA-Filter. W: W-Filter. AF: AF-Filter. WL: Weißlicht. UV: UV-Licht.

Ergebnisse

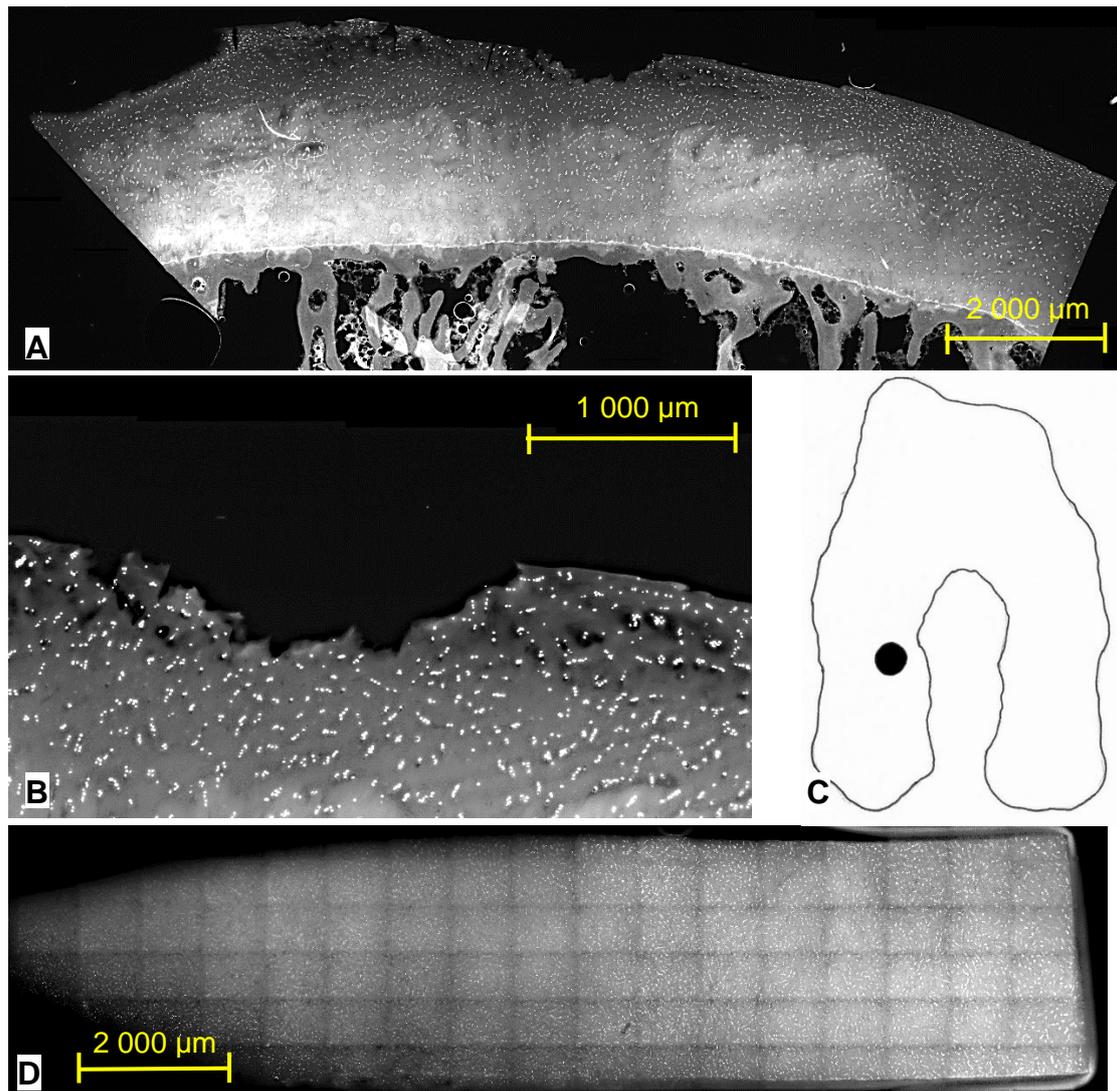


Abbildung 40: Knorpelschaden Nr. 1 histologisch Grad II.
 A: Übersichtsaufnahme im Querschnitt, aufgenommen in 100-facher Vergrößerung. Der Schaden wurde in der Histologie als zweit-gradig nach Outerbridge klassifiziert. Unten im Bild sieht man Knochen trabekel, oben den Knorpel. Die Zellkerne der Chondrozyten sind aufgrund der DAPI-Färbung im Bild weiß. B: Vergrößerter Ausschnitt der Knorpeloberfläche von A mit abnormem Knorpel bei einer Läsionstiefe < 50 % der Knorpeldicke. C: Lokalisation des Schadens in der Schablone. D: Top-Down-Aufnahme, aufgenommen in 100-facher Vergrößerung.

Kanal	Out	Kanal	Out	Kanal	Out
ALA/WL	II	W/ WL	II	AF/ WL	II
ALA/UV	II	W/ UV	III	AF/ UV	III
Histologie	II				

Tabelle 15: Knorpelschaden Nr. 1. Ergebnisse der Outerbridge-Klassifizierung pro Kanal.

Ergebnisse

Grad I: „intakte Oberfläche, Fibrillationen und/oder leichte Aufweichung“. Grad II: „Läsionstiefe < 50 % der Knorpeldicke (abnormaler Knorpel)“. Grad III: „Läsionstiefe > 50 % der Knorpeldicke, nicht bis zur kalzifizierenden Schicht“. Grad IV: „vollständiger Knorpelverlust (freiliegender subchondraler Knochen)“. Out: Outerbridge. ALA: ALA-Filter. W: W-Filter. AF: AF-Filter. WL: Weißlicht. UV: UV-Licht.

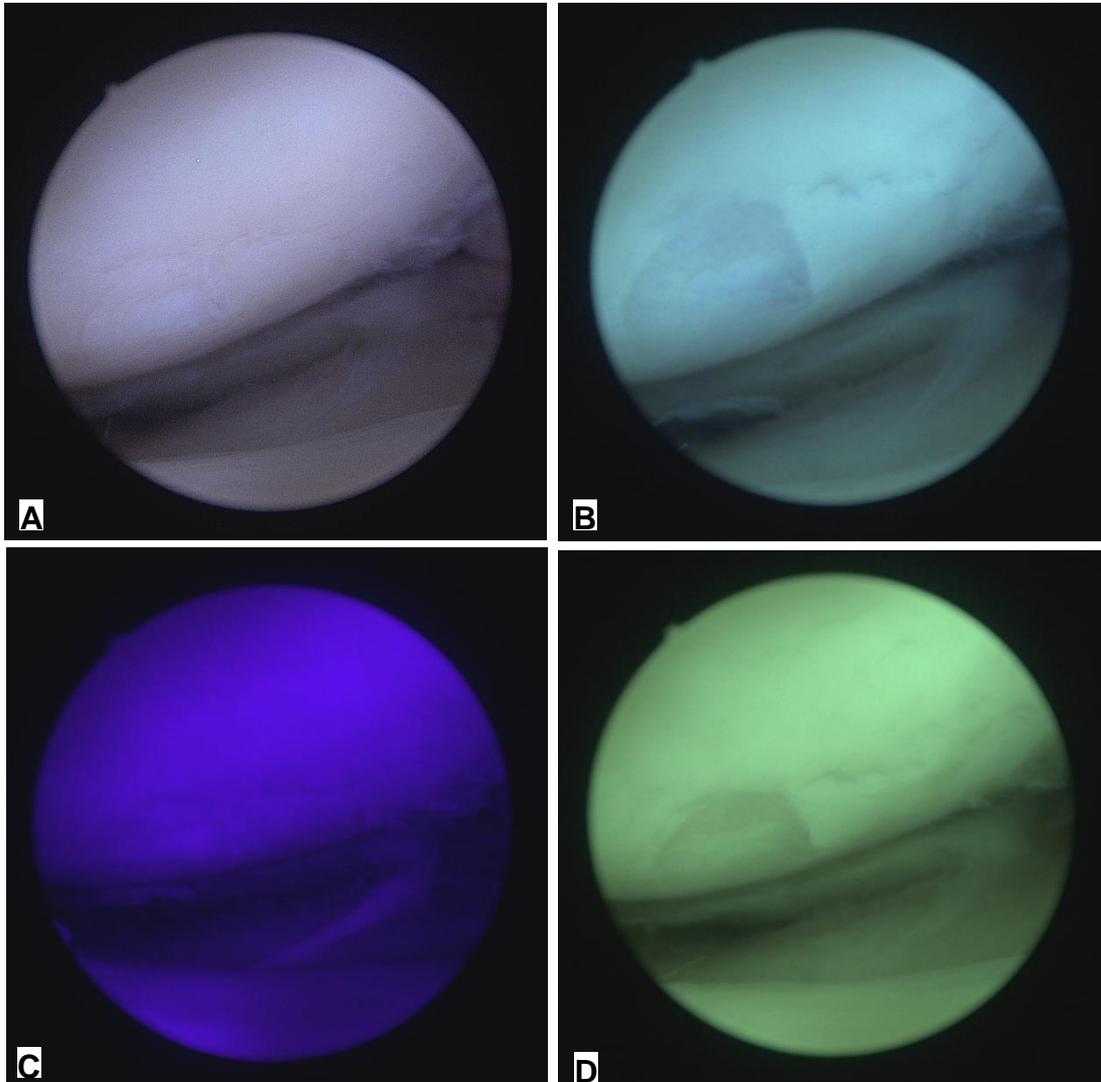


Abbildung 41: Knorpelschaden Nr. 1 arthroskopisch (histologisch Grad II). A: Arthroskopische Aufnahme im Standard-Kanal (W/ WL), zweit-gradig nach Outerbridge klassifiziert. B: Arthroskopische Aufnahme im ALA/ UV-Kanal, zweit-gradig klassifiziert. C: Arthroskopische Aufnahme im W/ UV-Kanal, dritt-gradig klassifiziert. D: Arthroskopische Aufnahme im AF/ UV-Kanal, dritt-gradig klassifiziert. A und B wurden richtig eingestuft, C und D falsch zu hoch. Die Abbildung bezieht sich auf Abbildung 40, Tabelle 15.

ALA: ALA-Filter. W: W-Filter. AF: AF-Filter. WL: Weißlicht. UV: UV-Licht.

Ergebnisse

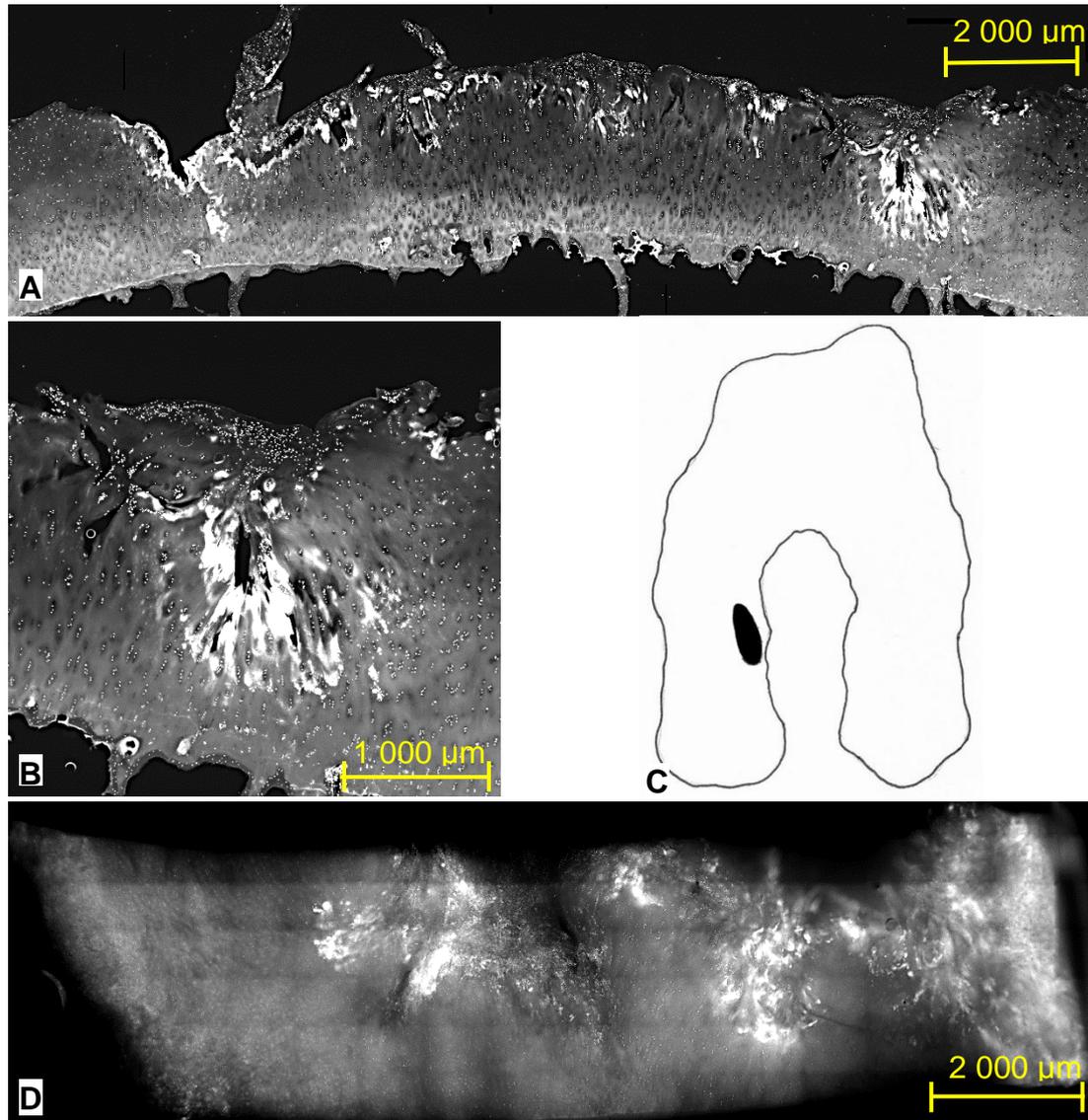


Abbildung 42: Knorpelschaden Nr. 4 histologisch Grad III.

A: Übersichtsaufnahme im Querschnitt, aufgenommen in 100-facher Vergrößerung. Der Schaden wurde in der Histologie als dritt-gradig nach Outerbridge klassifiziert. Unten im Bild sieht man Knochen trabekel, oben den Knorpel. Die Zellkerne der Chondrozyten sind aufgrund der DAPI-Färbung im Bild weiß. B: Vergrößerter Ausschnitt der Knorpeloberfläche von A mit einer Läsionstiefe > 50 % der Knorpeldicke, die nicht bis zur kalzifizierenden Schicht reicht. C: Lokalisation des Schadens in der Schablone. D: Top-Down-Aufnahme, aufgenommen in 100-facher Vergrößerung.

Kanal	Out	Kanal	Out	Kanal	Out
ALA/WL	II	W/ WL	II	AF/ WL	II
ALA/UV	II	W/ UV	III	AF/ UV	II
Histologie	III				

Ergebnisse

Tabelle 16: Knorpelschaden Nr. 4. Ergebnisse der Outerbridge-Klassifizierung pro Kanal.

Grad I: „intakte Oberfläche, Fibrillationen und/oder leichte Aufweichung“. Grad II: „Läsionstiefe < 50 % der Knorpeldicke (abnormaler Knorpel)“. Grad III: „Läsionstiefe > 50 % der Knorpeldicke, nicht bis zur kalzifizierenden Schicht“. Grad IV: „vollständiger Knorpelverlust (freiliegender subchondraler Knochen)“.
Out: Outerbridge. ALA: ALA-Filter. W: W-Filter. AF: AF-Filter. WL: Weißlicht. UV: UV-Licht.

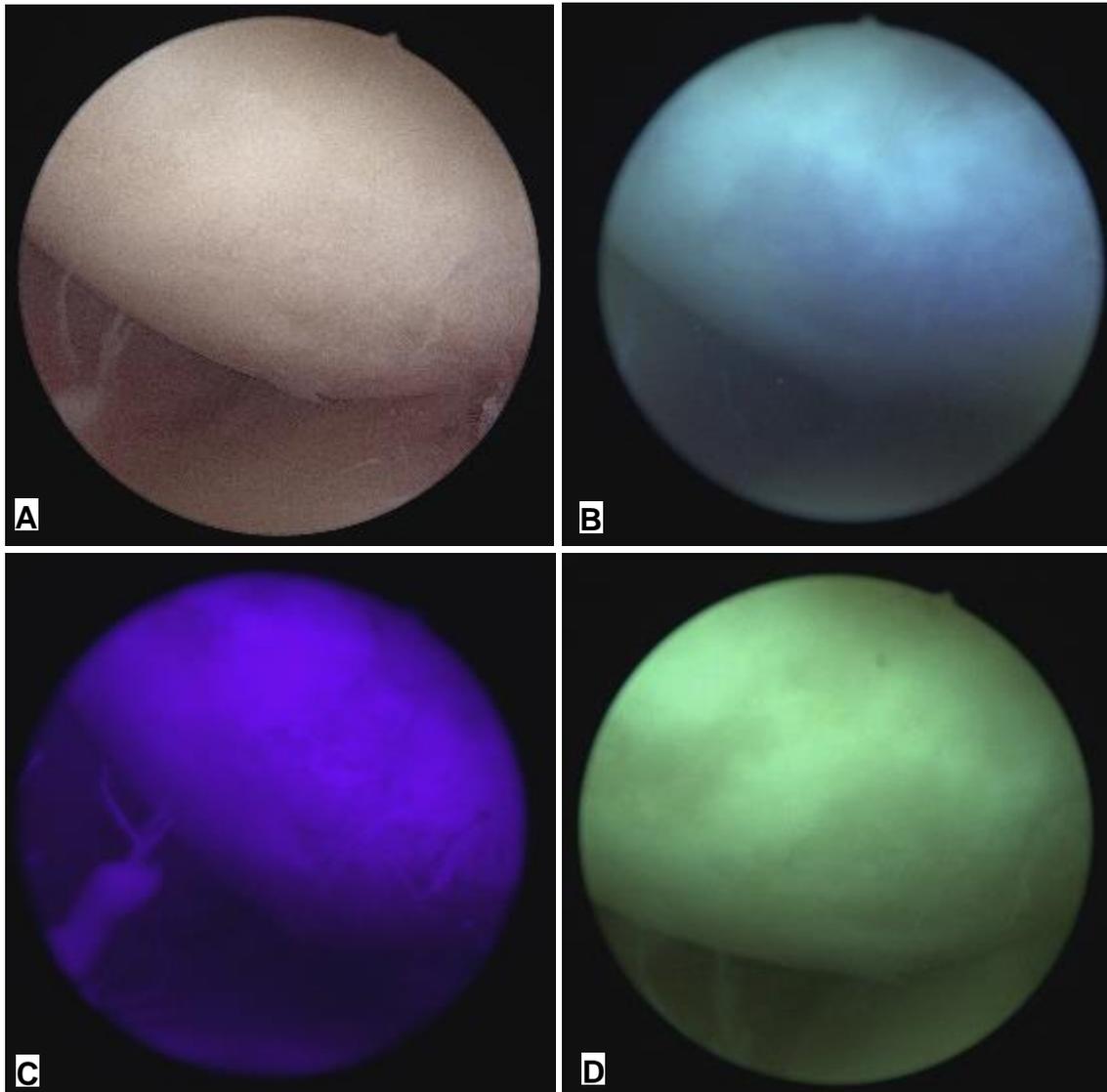


Abbildung 43: Knorpelschaden Nr. 4 arthroskopisch (histologisch Grad III).
A: Arthroskopische Aufnahme im Standard-Kanal (W/ WL), zweit-gradig nach Outerbridge klassifiziert. B: Arthroskopische Aufnahme im ALA/ UV-Kanal, zweit-gradig klassifiziert. C: Arthroskopische Aufnahme im W/ UV-Kanal, dritt-gradig klassifiziert. D: Arthroskopische Aufnahme im AF/ UV-Kanal, dritt-gradig klassifiziert. C wurde richtig eingestuft, A, B und D falsch zu niedrig. Die Abbildung bezieht sich auf Abbildung 42, Tabelle 16.

ALA: ALA-Filter. W: W-Filter. AF: AF-Filter. WL: Weißlicht. UV: UV-Licht.

Ergebnisse

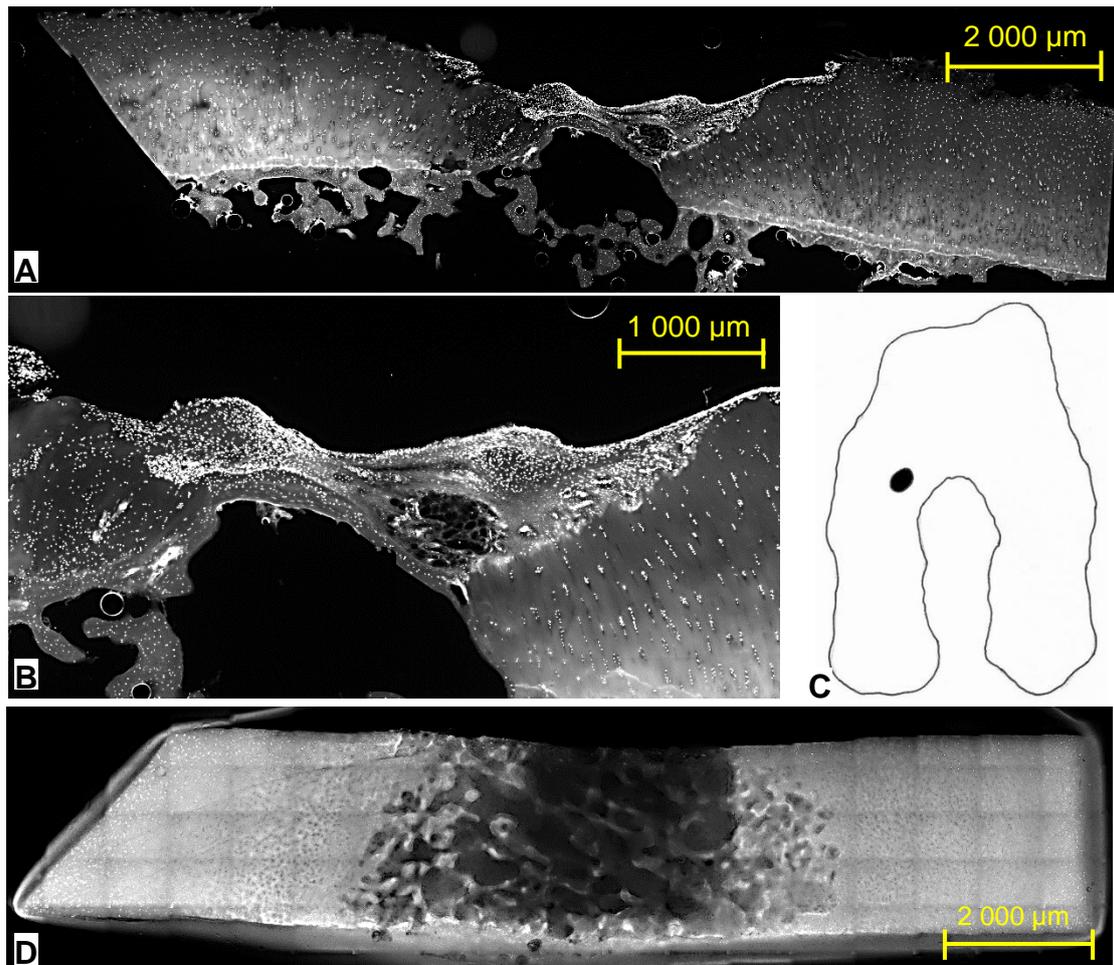


Abbildung 44: Knorpelschaden Nr. 6 histologisch Grad IV.

A: Übersichtsaufnahme im Querschnitt, aufgenommen in 100-facher Vergrößerung. Der Schaden wurde in der Histologie als viert-gradig klassifiziert. Unten im Bild sieht man Knochen trabekel, oben den Knorpel. Die Zellkerne der Chondrozyten sind aufgrund der DAPI-Färbung im Bild weiß. B: Vergrößerter Ausschnitt der Knorpeloberfläche von A mit vollständigem Knorpelverlust bei freiliegendem subchondralen Knochen. C: Lokalisation des Schadens in der Schablone. D: Top-Down-Aufnahme, aufgenommen in 100-facher Vergrößerung.

Kanal	Out	Kanal	Out	Kanal	Out
Std/ALA/WL	IV	Std/ W/ WL	IV	Std/ AF/ WL	IV
Std/ALA/UV	IV	Std/ W/ UV	IV	Std/ AF/ UV	IV
Histologie	IV				

Tabelle 17: Knorpelschaden Nr. 6. Ergebnisse der Outerbridge-Klassifizierung pro Kanal.

Grad I: „intakte Oberfläche, Fibrillationen und/oder leichte Aufweichung“. Grad II: „Läsionstiefe < 50 % der Knorpeldicke (abnormaler Knorpel)“. Grad III: „Läsionstiefe > 50 % der Knorpeldicke, nicht bis zur kalzifizierenden Schicht“. Grad IV: „vollständiger Knorpelverlust (freiliegender subchondraler Knochen)“.

Ergebnisse

Out: Outerbridge. ALA: ALA-Filter. W: W-Filter. AF: AF-Filter. WL: Weißlicht. UV: UV-Licht.

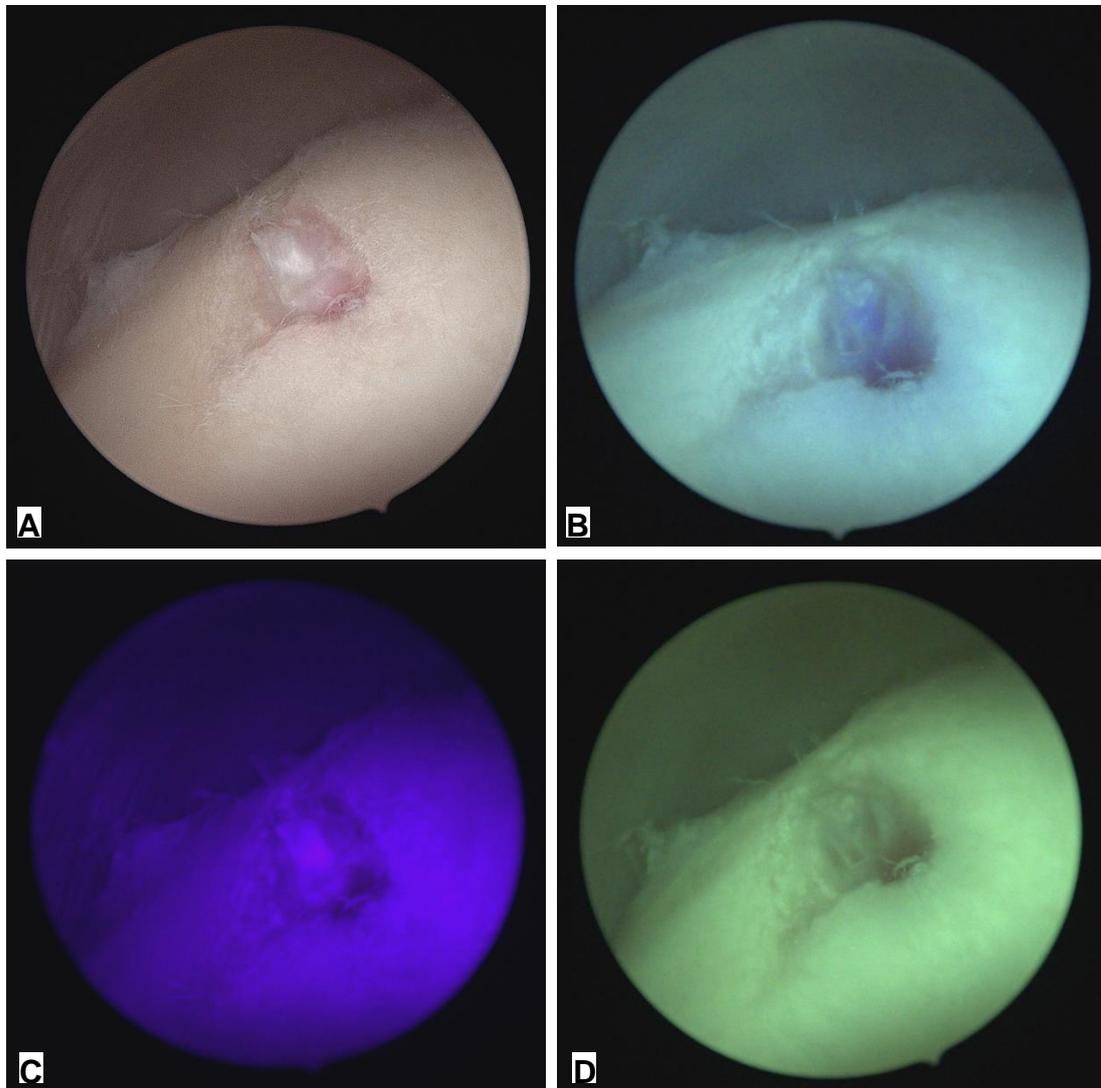


Abbildung 45: Knorpelschaden Nr. 6 arthroskopisch (histologisch Grad IV). A: Arthroskopische Aufnahme im Standard-Kanal (W/ WL), viert-gradig nach Outerbridge klassifiziert. B: Arthroskopische Aufnahme im ALA/ UV-Kanal, viert-gradig klassifiziert. C: Arthroskopische Aufnahme im W/ UV-Kanal, viert-gradig klassifiziert. D: Arthroskopische Aufnahme im AF/ UV-Kanal, viert-gradig klassifiziert. Alle Aufnahmen wurden somit korrekt eingestuft. Die Abbildung bezieht sich auf Abbildung 44, Tabelle 17.

ALA: ALA-Filter. W: W-Filter. AF: AF-Filter. WL: Weißlicht. UV: UV-Licht.

Die Ergebnisse der Outerbridge-Klassifikation der Arthroskopie-Kanäle jedes Knorpelschadens wurde mit dem entsprechenden histologischen Ergebnis verglichen. In der Arthroskopie wurden oft mehr zweit-gradige Schäden

Ergebnisse

klassifiziert als tatsächlich in der Histologie nachgewiesen. Andererseits wurden in der Histologie mehr erst- und viert-gradige Läsionen nachgewiesen als in einigen Kanälen in der Arthroskopie eingeordnet (Abbildung 46). In der Arthroskopie wurden in den Weißlicht-Kanälen insgesamt 68 % der Knorpelschäden korrekt eingeordnet, 26 % der Schäden wurden falsch zu niedrig und 6 % falsch zu hoch eingestuft. Unter UV-Licht wurden hingegen 64 % der Bilder richtig klassifiziert und jeweils 18 % zu hoch und zu niedrig eingeschätzt (Tabelle 18). Um zu überprüfen, unter welcher Lichtquelle und in welchem Kanal die Outerbridge-Klassifikation der Arthroskopie-Bilder stärker mit derer der Histologie-Ergebnisse übereinstimmt, wurden Abweichungen berechnet. Die absolute Differenz zwischen dem Grad an Knorpelschaden in der Arthroskopie und dem der Histologie betrug maximal eins. 66 % aller Aufnahmen wiesen keine Abweichung zur Kontrolle auf, 34 % wichen um einen Grad nach Outerbridge ab (Tabelle 18). Unter separater Betrachtung der Kanäle wies die Beurteilung unter den Kanälen ALA/ WL und W/ UV mit jeweils 77,8 % richtigen Zuordnungen die wenigsten Differenzen zur histologischen Kontrolle auf. Unter dem Kanal ALA/ UV kam es zu den häufigsten Fehleinschätzungen. 44,4 % der Schäden unter ALA/ UV wurden nicht korrekt klassifiziert (Abbildung 47). Es gab jedoch keinen signifikanten Unterschied der Differenzen der Outerbridge-Klassifizierungen zwischen den Kanälen, Kruskal-Wallis-H = 1,819; df = 5; p = 0,874.

Ergebnisse

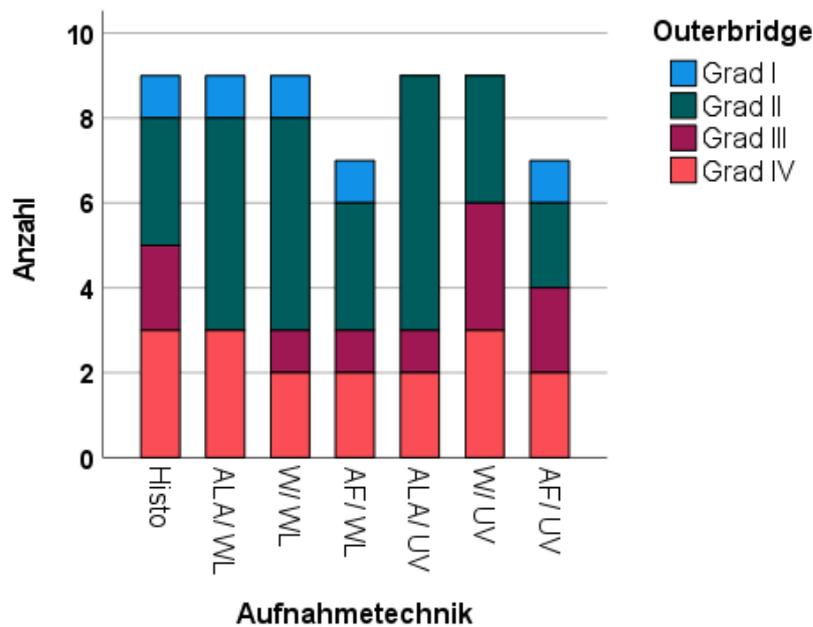


Abbildung 46: Anzahl befundeter Bilder nach Outerbridge-Klassifikation pro Kanal und histologische Ergebnisse.

Grad I: „intakte Oberfläche, Fibrillationen und/oder leichte Aufweichung“. Grad II: „Läsionstiefe < 50 % der Knorpeldicke (abnormaler Knorpel)“. Grad III: „Läsionstiefe > 50 % der Knorpeldicke, nicht bis zur kalzifizierenden Schicht“. Grad IV: „vollständiger Knorpelverlust (freiliegender subchondraler Knochen)“. X-Achse: Darstellung nach Kanälen und Histologie. Y-Achse: Anzahl der Bilder. ALA: ALA-Filter. W: W-Filter. AF: AF-Filter. WL: Weißlicht. UV: UV-Licht.

		Out ASK – WL			Out ASK – UV			
		Zu niedrig	Richtig	Zu hoch	Zu niedrig	Richtig	Zu hoch	
Histo- logie	Grad I	Anzahl	/	3	3	/	1	5
	Grad II	Anzahl	0	16	0	0	12	4
	Grad III	Anzahl	9	1	0	6	4	0
	Grad IV	Anzahl	4	14	/	3	15	/
Gesamt		Anzahl	13	34	3	9	32	9
		% von Out ASK	26 %	68 %	6 %	18 %	64 %	18 %

Tabelle 18: Anzahl der nach Outerbridge-Klassifikation richtig und falsch zu hoch/niedrig eingestuften Arthroskopie-Aufnahmen aller Weiß- und UV-Licht-Kanäle in Bezug auf die histologische Kontrolle

Out: Outerbridge. ASK: Arthroskopie. WL: Weißlicht. UV: UV-Licht.

Ergebnisse

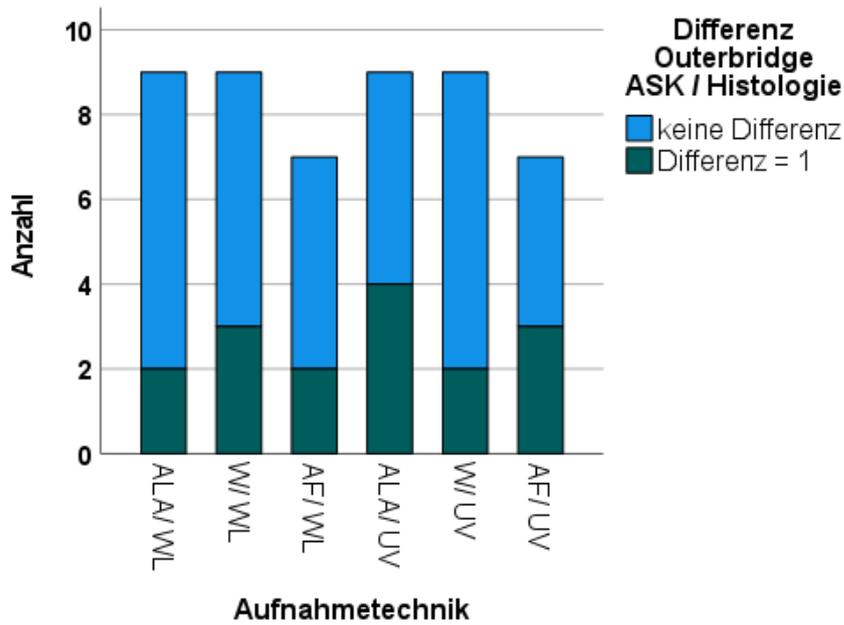


Abbildung 47: Anzahl Bilder nach Differenz zwischen Outerbridge-Score in der ASK und Outerbridge-Score in der Histologie pro Kanal. Die maximale Differenz betrug eins. X-Achse: Darstellung nach Kanälen. Y-Achse: Anzahl der Bilder. ALA: ALA-Filter. W: W-Filter. AF: AF-Filter. WL: Weißlicht. UV: UV-Licht.

4 Diskussion

4.1 Hintergrund

Die diagnostische Arthroskopie stellt derzeit den Goldstandard zur Beurteilung und Klassifikation von Gelenkknorpelschäden dar. Dabei erfolgt sowohl eine optische als auch eine taktile Beurteilung mittels Tasthaken unter dem standardmäßig in der Arthroskopie verwendeten Weißlicht. Derzeit sind, abgesehen von der Beurteilung durch den Arthroskopeur mittels Sondierung mit dem Tasthaken, noch keine weiteren klinischen arthroskopischen Instrumente zur Knorpelbeurteilung in der routinemäßigen Anwendung in Verwendung. Die präzise Klassifizierung von Knorpelschäden ist von immenser Bedeutung, da die Art der Therapie vom Grad des Schadens abhängt. Besonders die Differenzierung zwischen Schäden Grad II und Grad III ist für die weiteren therapeutischen Maßnahmen entscheidend, da ab dritt-gradigen Schäden primär operativ therapiert wird, während zweit-gradige konservativ behandelt werden. Daher besteht weiterhin ein Bedarf zur Verbesserung der Diagnostik. Diagnostische Methoden zur Beurteilung von Knorpelschäden sollen einerseits eine möglichst geringe Invasivität aufweisen, andererseits einfach zu handhaben und im klinischen Alltag möglichst zeitsparend anwendbar sein. In der Arthroskopie wurden in der Vergangenheit verschiedene Ansätze entwickelt. Zum Beispiel wurden Ultraschall und optical coherence tomography (OCT) Bildgebung zur Beurteilung von Knorpelschäden angewandt. Diese Methoden haben sich jedoch bisher nicht durchgesetzt [51, 97]. Es wurden bereits einige Untersuchungen mittels Nahinfrarot-Spektroskopie gemacht. Dabei wurde gemessen, wie sich die Absorption des Anregungslichtes bei defektem Knorpel im Vergleich zum Gesunden verhielt. Spahn et al. stellten fest, dass die Höhe der Absorption des Spektrallichtes und die Schwere des Knorpelschadens miteinander korrelieren [88]. Jedoch konnte die Methode sich noch nicht in der klinischen Anwendung durchsetzen [77]. In dieser Arbeit hat man sich die autofluoreszenten Eigenschaften des Kollagen II des hyalinen Gelenkknorpels zu Nutze gemacht. Unter ultraviolettem Licht fluoresziert intakter Gelenkknorpel in bläulicher Farbe. Aufgrund der Annahme, dass geschädigter Knorpel weniger Licht emittiert [50], sollten sich Knorpelschäden unter UV-Licht gut sichtbar vom

Diskussion

gesunden Gewebe abheben. In der Arbeit wurde die Arthroskopie unter Verwendung von Standard-Weißlicht und UV-Licht an Kadaverknien durchgeführt. Die Arthroskopie unter Verwendung von Autofluoreszenz sollte mit der Standard-Arthroskopie im Hinblick auf die Genauigkeit der Klassifikation von Knorpelschäden nach Outerbridge verglichen und der diagnostische Mehrwert von UV-Licht in der Arthroskopie evaluiert werden.

4.2 Methodenkritik

4.2.1 Arthroskopie

In der Studie wurden Knorpelschäden ex vivo arthroskopisch mittels Autofluoreszenz unter ultraviolettem Licht beurteilt und klassifiziert. Als Anregungslicht diente ein Spektrum von 380 – 430 nm, sowie eine bläuliche Hintergrundbeleuchtung von 430 – 470 nm. Die Arthroskopie unter UV-Licht konnte aufgrund der Autofluoreszenz des Gelenkknorpels ohne Fluoreszenzfarbstoff erfolgen. Dadurch ist das Verfahren unkompliziert und zeitsparend. In der onkologischen Fluoreszenzdiagnostik hingegen beträgt der zusätzliche Zeitaufwand bei der Anwendung der Fluoreszenz-Arthroskopie zwei Stunden, da extra ein Fluorophor, wie beispielsweise 5'-ALA, zugeführt werden muss [1]. Die hier präsentierte Methode ließe sich ohne zeitlichen Mehraufwand, Änderung des operativen Ablaufs oder zusätzliche Instrumente in die klinische Arthroskopie einbauen. Bei der Darstellung und Beurteilung von Knorpelschäden unter UV-Licht muss lediglich ein Schalter betätigt werden, um vom Standard-Weißlicht zum ultravioletten Anregungslicht zu wechseln. Über die Kamera wird das Bild genau wie bei der Standardarthroskopie betrachtet, ohne, dass ein direkter Kontakt zum Knorpel oder weitere Messungen erforderlich sind. Sarin et al. beurteilten Gelenkknorpelschäden in der Arthroskopie in vivo mittels Nahinfrarotspektroskopie. Dabei trat jedoch die Problematik ein, in der Arthroskopie adäquaten Kontakt der Spektralsonde zum Knorpel herzustellen [69, 77]. Bei der UV-Arthroskopie hingegen ist kein direkter Kontakt zum Gewebe erforderlich, was das Risiko potenzieller Schäden minimiert. Jedoch hängt die auf den Knorpel einfallende Lichtmenge nach dem Abstands-Quadratgesetz vom Abstand zum Knorpel ab. Demnach darf der Abstand nicht zu groß sein. Falls in

Diskussion

Zukunft weitere Untersuchungen stattfinden, könnte man analysieren, welcher Abstand idealerweise benötigt wird.

4.2.2 Histologische Versuche

Als Referenz wurden die Knorpelschäden nach der Arthroskopie auf histologischer Ebene ebenfalls nach Outerbridge klassifiziert. Dafür wurden histologische Querschnitte sowie Top-Down-Präparate angefertigt. Die Präparate wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI gefärbt und anschließend am Fluoreszenzmikroskop abgebildet und beurteilt. Anhand der am Mikroskop aufgenommenen Bilder der Präparate wurden die Knorpeldefekte vermessen und klassifiziert. Die volle Breite der Knorpelschäden ließ sich methodenbedingt nicht berechnen. Die Breite kann lediglich in der Top-Down-Aufnahme und nicht im Querschnitt dargestellt werden. Die Präparate wurden jedoch so geschnitten, dass der Rand des Top-Down-Präparates genau durch die Mitte des Knorpelschadens geht, und die andere Hälfte der Anfertigung von Querschnitten diente. Dadurch ist jeweils nur die Hälfte des Knorpelschadens in der Top-Down-Aufnahme abgebildet und die Größe kann in der vollen Ausdehnung nicht bestimmt werden. Um das volle Ausmaß des Schadens abzubilden, müssten beispielsweise zunächst Top-Down-Präparate des kompletten Knorpelschadens angefertigt und mikroskopiert werden. Im Anschluss könnte das Präparat zu Querschnitten verarbeitet werden, in denen dann die Tiefe des Schadens über die gesamte Fläche bestimmt wird. Alternativ könnte eine 3D-Bildgebung beispielsweise mittels μ CT durchgeführt werden.

Um korrekte Kontrollergebnisse zu erhalten, muss man stets den tiefsten Punkt des Schadens im Querschnitt abbilden. Es hat sich als technisch sehr anspruchsvoll herausgestellt, die tiefste Fissur oder Stelle des Schadens zu treffen, da die Schnitte ohne Vergrößerung durchgeführt wurden. Um die Genauigkeit der Referenzergebnisse sicher zu stellen, könnte zum Beispiel das Schneiden des Knorpels (2.2.3) bei starker Vergrößerung unter dem Mikroskop statt mit bloßem Auge bei zukünftigen Versuchen eine höhere Belastbarkeit der Ergebnisse bieten. Eine weitere Möglichkeit zur Analyse der Defekttiefe wäre die Anwendung eines Flachbrettscanners mit anschließender digitaler Bildanalyse.

Diskussion

Johansson et al. wandten die Methode zur Berechnung von Referenzwerten in einer Studie zur „Darstellung und Quantifizierung von Knorpelläsionen in menschlichen Kniegelenken“ an [35]. Da die Messmethode untersucherunabhängig wäre, handelt es sich um eine gute Alternative zur verwendeten Methode.

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Befundungsqualität

Die Observer konnten die Arthroskopiebilder von „adäquat befundbar“ über „ausreichend befundbar“ bis „unzureichend befundbar“ einstufen. Bei der Befundungsqualität wurden die Ergebnisse von allen Observern aus drei Auswertungsrunden ausgewertet.

Die Observer stuften die Bilder unter UV-Licht mit 14,5 % der UV-Bilder deutlich seltener als „adäquat zu befunden“ ein im Vergleich zum Weißlicht mit 73,3 % der WL-Bilder. Es stellt sich die Frage, woran die schlechte Befundungsqualität der UV-Bilder liegt. Es ist möglich, dass aufgrund der Autofluoreszenz des Knorpels Knorpelschäden schlechter im Bild dargestellt werden. Ein anderer Grund wäre eine über den Schaden hinaus gehende, die gesamte Arthroskopie-Aufnahme betreffende, gänzlich schlechtere Bildqualität. Bei der Betrachtung der UV-Bilder im Vergleich zu den Weißlicht-Bildern fällt auf, dass die Bilder generell viel dunkler und vor allem sehr unscharf sind (Abbildung 43). Dies trifft nicht nur auf die Region des Knorpelschadens zu, sondern auf das gesamte Bild. Folglich kann man vermuten, dass die schlechte Aufnahme- und Bildqualität ursächlich für die schlechte Befundungsqualität unter UV-Licht sind. Grund dafür dürften die Einstellungen von Lichtquelle und Filter bei der Arthroskopie sein. Da es sich bei den Untersuchungen um Vorversuche für eine mögliche klinische Studie handelte, wurden bereits vorhandene Filter und Lichtquellen von Storz verwendet. Das in der Arbeit verwendete UV-Licht umfasste das Spektrum von 380 – 430 nm, während das Anregungsmaximum für Kollagen II bei 335 nm liegt. Außerdem ließ der AF-Filter nur Wellenlängen zwischen 470 und 1000 nm und der ALA-Filter 450 – 1000 nm durch, obwohl das Emissionsmaximum bei 390 – 430 nm und somit außerhalb des Bereichs liegt. Bei der Arthroskopie unter

Diskussion

UV-Licht waren die Einstellungen der Filter sowie das Anregungslicht also nicht geeignet, um Gelenkknorpel darzustellen. Die bei der Arbeit verwendeten Filter und das Anregungslicht wurden ursprünglich für andere medizinische Bereiche wie die Tumorfürdiagnostik (1.4.3.) konzipiert aber nicht für die Beurteilung von Gelenkknorpel.

Aus den Analysen ging hervor, dass der Standard-Kanal (Std/ W/ WL) von allen Kanälen am besten zu befunden war. Die gute Auswertungsqualität unter dem Standard-Kanal im Weißlicht spricht für dessen Verwendung als Standard zur Beurteilung von Gelenkknorpelschäden. Auf der anderen Seite wurde die gleiche Filter-Licht-Kombination unter UV-Licht am häufigsten als unzureichend befundbar eingestuft, obgleich der W-Filter unter UV-Licht noch am ehesten das emittierende Licht durchlassen müsste, da er bei seinem umfassenden Spektrum von 400 – 750 nm einen Teil des Emissionsmaximums des Kollagen II umfasst. Die schlechte Befundungsqualität im W-Filter unter UV-Licht sollte also nicht ausschließlich am Spektrum des Filters liegen. Während der Versuche hat man schnell festgestellt, dass unter UV-Licht die Helligkeit des Lichts stark reduziert werden muss, da ansonsten das Bild überblendet. Beim W-Filter war die Überblendung unter UV-Licht so stark, dass die Lichtquelle (PDD) lediglich auf 5 % gestellt wurde. Bei so einer geringen Beleuchtung sollte mit Einbußen bei der Bildqualität und Befundung gerechnet werden. Je weniger Licht bei der Aufnahme auf den Knorpel fällt, desto schwerer ist es, Bildrauschen zu unterdrücken und ein scharfes Bild zu generieren. Bei starker Dunkelheit kommt es außerdem oft zu einem verwackelten Bild bei langer Belichtungszeit. Unter UV-Licht kommt obendrein eine geringere Spannbreite an Wellenlängen bei der Kamera an als unter Weißlicht. Wie bereits erwähnt, wurde das Emissionsmaximum bei zwei von drei Filtern bereits komplett und beim W-Filter zum Teil herausgefiltert. Dadurch kommt nur noch sehr wenig Licht bei der Kamera an und das Bild wird dunkel. Unter Weißlicht hingegen kann das gesamte Spektrum sichtbaren Lichts auf der Kamera abgebildet werden. Die Aufnahme von scharfen, gut auswertbaren Bildern erweist sich demzufolge unter UV-Licht deutlich schwieriger als unter Weißlicht.

Diskussion

Da die Methode der Arthroskopie von Knorpelschäden unter Autofluoreszenz das erste Mal getestet wurde, sind noch keine vergleichbaren Arbeiten vorhanden. Nguyen et al. wandten jedoch Autofluoreszenz in der ASK bei Kreuzbandplastiken an Leichenknien an [60]. Ziel der Studie war die Verbesserung der Visualisierung von Gelenkstrukturen während der ASK anhand von Autofluoreszenz-Bildgebung. Im Gegensatz zu dieser Arbeit wurde nicht nur UV-Licht verwendet, sondern ein blauer, roter und grüner Farbkanal. Der rote und grüne Kanal wurde anschließend anhand spektraler Auftrennung („spectral unmixing“) verarbeitet. In der Autofluoreszenz-Arthroskopie war die Bildqualität ähnlich zu dieser Arbeit. Nguyen et al. bemängelten vor allem den Kontrast. Erst durch die spektrale Aufarbeitung und Trennung der Kanäle wurde ein guter Kontrast von Knorpel, Knochen und Bandstrukturen erreicht [60]. Folglich entwickelten Nguyen et al. keinen Ansatz zur verbesserten intraoperativen direkten Visualisierung unter UV-Licht, jedoch scheint die nachträgliche Aufarbeitung intraoperativ aufgenommener Bilder ein Ansatz zu sein, um den Kontrast zu verbessern [60].

In der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde wurden einige Verfahren unter Autofluoreszenz mit dem Storz-PDD-System unter Verwendung des ALA-Filters zur Identifikation von kanzerösem Gewebe durchgeführt. Dabei war die Untersuchung der Befundungsqualität zwar nicht Teil der Studie, jedoch wurde die Bildqualität unter UV-Licht bemängelt [1, 5]. Der ALA-Filter wurde unter UV-Licht bezüglich der Befundungsqualität im Gegensatz zu beiden anderen Filtern noch am häufigsten als adäquat oder ausreichend befundbar eingeteilt. Unter UV-Licht ist das Bild beim ALA-Filter aufgrund des größten durchgelassenen Spektrums das hellste im Vergleich zu den anderen Filtern. Das könnte ursächlich für die bessere Befundungsqualität des Filters sein. Außerdem wiesen Knorpelschäden bei dem Filter mit ihrer blau-lila Farbe einen guten Kontrast zum umliegenden bläulich-grünem Knorpelgewebe auf. Es ist denkbar, dass durch Weiterentwicklung der Storz-PDD-Systems mit Optimierung des Spektrums der Lichtquelle und der Filter auch die Bildqualität und die Befundungsqualität verbessert werden können.

Diskussion

Die statistische Auswertung der Arbeit wurde trotz schlechter Befundungsqualität unter UV-Licht weitergeführt. Grund dafür ist der explorative Charakter der Studie. Dennoch wurden Einschränkungen vorgenommen, wie der Ausschluss der Bilder mit künstlichem grünem Filter und der Bilder des Chroma-Programms.

4.3.2 Auswertung der Defekterkennung

Für die Analyse der Ergebnisse von Outerbridge, Fissuren und Größe wurde die dritte Auswertungsrunde des zweiten Observers aus der Arthroskopie herangezogen. Die Bilder wurden von Grad I bis Grad IV nach Outerbridge eingeteilt. Aus den Analysen geht hervor, dass dritt- und viert-gradige Schäden häufiger unter UV-Licht und erst- und zweitgradige Läsionen häufiger unter Weißlicht befundet wurden. Die Vermutung liegt nahe, dass unter Autofluoreszenz der Kontrast zwischen gesundem Knorpel und Schäden in der Arthroskopie stärker dargestellt wird und dadurch einige Schäden gravierender wirken können. Da jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen der Bewertung unter Weiß- und UV-Licht berechnet wurde, handelt es sich nur um eine deskriptive Beobachtung.

Laut Meinung der Studienärzte in der Arthroskopie konnten unter UV-Licht im Vergleich zum Standard teils gute Unterschiede bezüglich der Größe von Knorpelschäden oder der Darstellung von Fissuren erkannt werden. Unter dem W-Filter schienen sich unter UV-Licht gut Fissuren und Risse darzustellen, während sich unter dem ALA-Filter flächige Schäden unter UV-Licht kontrastreicher darstellen würden. Die Daten der Studie bestätigten die Beobachtung jedoch nicht. Es stellte sich vielmehr heraus, dass unter allen UV-Kanälen entweder keine Fissuren oder nur Hauptfissuren erkennbar waren. Seitenäste oder Nebenäste waren nur im Weißlicht ersichtlich. Weiterhin ergaben die Daten zwar, dass unter den meisten Kanälen der Median der Größe unter UV-Licht höher war als unter Weißlicht, aber ohne signifikanten Unterschied ist dies auch nur eine deskriptive Beobachtung.

Insgesamt traten bei der Auswertung weder bei der Outerbridge-Klassifikation noch bei der Darstellung von Fissuren oder bei der Defektgröße signifikante

Diskussion

Unterschiede zwischen den Kanälen auf. Demnach bestand auch kein Unterschied zwischen der Befundung unter Weiß- und UV-Licht.

4.3.3 Reliabilität

Die Aufnahmen der arthroskopischen Schäden wurden von drei Observern in drei Auswertungsrunden im Standard-Arthroskopie-Kanal (Std/ W/ WL) bezüglich Defekttiefe nach Outerbridge, Darstellung von Fissuren sowie Größe bewertet. Als Observer fungierten ein Assistenzarzt der Orthopädie im ersten Weiterbildungsjahr, ein Assistenzarzt im vierten Weiterbildungsjahr, sowie ein Oberarzt der Orthopädie und Unfallchirurgie. Zwischen der zweiten und dritten Auswertungsrunde erfolgte ein Training, um einen einheitlichen Bewertungsmaßstab zu etablieren.

Die Interobserverreliabilität zwischen drei Observern in der zweiten Auswertungsrunde war bezüglich der Outerbridge-Klassifikation mäßig bis substanzial ($0,237 \leq \kappa \leq 0,695$) und bezüglich der Fissuren mäßig bis substanzial ($0,224 \leq \kappa \leq 0,684$). Für die Interratervariabilität könnte ursächlich sein, dass die Observer kein gleich großes Maß an Erfahrung hatten. Es wäre denkbar, dass bei gleicher Berufs- und Arthroskopie-Erfahrung oder auch in der dritten Auswertungsrunde nach dem Training die Daten besser übereinstimmen würden. Ebenfalls wäre möglicherweise die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei einem höheren Grad an Erfahrung größer. Dann müsste man jedoch davon ausgehen, dass stets die Daten der Rater mit der meisten Erfahrung am meisten übereinstimmen. Dem widerspricht jedoch, dass in der zweiten Runde der Auswertung der Fissuren die Daten von Rater zwei und drei trotz geringerer Erfahrung im Vergleich zu Rater eins am meisten übereinstimmten.

In einer Untersuchung von Spahn et al. zur Interraterreliabilität der ICRS-Klassifikation in der Arthroskopie setzte man vier Observer mit hohem Erfahrungsgrad (mehr als 5000 Kniearthroskopien) ein [86]. Beim Vergleich der Reliabilitäten zeigte sich jedoch, dass die Werte bei Spahn et al. eine noch geringere Übereinstimmung als in dieser Arbeit aufweisen ($0,127 \leq \kappa \leq 0,222$) [86]. Man kann einerseits folgern, dass ein hohes Maß an Erfahrung tatsächlich nicht zu mehr Übereinstimmung führt. Andererseits kann man zu dem Schluss

Diskussion

kommen, dass die Klassifikation nach Outerbridge in der Arthroskopie stets eine gewisse Interobserver-Variabilität aufweist, da die Einteilung wie auch in dieser Arbeit aufgrund subjektiver Beobachtung erfolgt. Laut Spahn et al. sei die hohe Variabilität methodenbedingt, da es sich bei der Graduierung von Knorpelläsionen nach Scores um eine rein subjektive Methode handle [86, 87]. Die These lässt sich dadurch stützen, dass die Daten der Rater dieser Studie bei der Größe der Knorpeldefekte deutlich mehr übereinstimmten als bei Outerbridge und Fissuren ($0,731 \leq \text{ICC} \leq 0,823$). Die Größe wurde in Pixeln am Computer ausgemessen und ist demnach keine subjektive Messmethode. Eine höhere Übereinstimmung könnte man bei zukünftigen Studien trotzdem durch Erhöhung der Fallzahl bewirken. Bei der angeführten Studie von Spahn et al. wurde mit 15 Patienten ebenfalls eine geringe Probandenzahl in die Studie eingeschlossen [86]. Genauere Ergebnisse wären bei größerer Fallzahl möglich.

Zur Bestimmung der Intraobserverreliabilität wurden die Daten jedes Observers jeweils für die erste und zweite Auswertungsrunde verglichen. Die Übereinstimmung der Daten nach Outerbridge war moderat bis substanziell ($0,55 \leq \kappa \leq 0,66$). Die Daten der Beurteilung von Knorpelfissuren in Runde eins und zwei glichen sich gering bis fast perfekt ($0,1 \leq \kappa \leq 0,833$), wobei der Rater mit der meisten Erfahrung die geringste und der mit der wenigsten Erfahrung die größte Übereinstimmung aufwies. Dies stützt obige These, dass ein hohes Maß an Erfahrung nicht unbedingt mit geringerer Variabilität der Befundung einhergeht. Außerdem zeigen die Beobachtungen, dass die Klassifikation nach Outerbridge hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit eingeschränkt ist, da selbst dieselbe Person zu verschiedenen Zeitpunkten in ihrer Einteilung variiert. Vor diesem Hintergrund muss die Klassifikation nach Outerbridge und vor allem die Klassifikation nach ICRS angezweifelt werden, da die ICRS-Klassifikation noch mehr Kategorien zum Einordnen schafft. Hier ein erneuter Verweis zur obigen Studie zur Reliabilität der ICRS-Klassifikation in der Arthroskopie, bei der die Übereinstimmung noch geringer als in dieser Arbeit war, in der wiederum Outerbridge verwendet wurde [86, 87].

Gleiches gilt für die Interraterreliabilität. Die hohe Intra- und Interratervariabilität bei der Bewertung von Knorpelschäden konnte bereits bei vielen

Diskussion

Untersuchungen bestätigt werden [30, 86, 87]. Bei der arthroskopischen Klassifikation nach Outerbridge sowie nach ICRS handelt es sich immer um eine rein deskriptive, subjektive Methode, die vom Beurteiler abhängig ist. Demnach war in der Arbeit mit untersucherabhängigen Differenzen der Werte zu rechnen. Um objektive Daten zu garantieren, müssten reproduzierbare Messungen erfolgen, welche nicht untersucherabhängig sind, wie zum Beispiel bei der Nahinfrarotspektroskopie (NIRS) [87]. Einige Untersuchungen haben signifikante Korrelationen zwischen Untersuchern von Knorpelschäden bei der NIRS im Gegensatz zur subjektiven Klassifikation anhand von Scores festgestellt [30, 86].

4.3.4 Vergleich mit histologischer Kontrolle

Beim Vergleich der klassifizierten Arthroskopie-Aufnahmen mit den histologischen Referenzwerten zeigten sich interessante Abweichungen. Histologische Knorpelschäden zweiten Grades waren in der Autofluoreszenz-Arthroskopie oft höher eingestuft, während dritt-gradige Schäden oft zu niedrig eingestuft wurden. Unter UV-Licht wurden 33,3 % der zweit-gradigen und 60 % der dritt-gradigen Schäden falsch eingestuft. In der Standard-Arthroskopie wurden zwar alle zweit-gradigen Schäden korrekt beurteilt, dafür aber 90 % der Schäden dritten Grades zu niedrig eingestuft (Tabelle 18). Hier wird noch einmal betont, wie wichtig die präzise Einteilung der Schäden ist, da insgesamt 36,5 % der Fälle, die einen Grad II oder III Schaden hatten, falsch therapiert worden wären. Ziel der Arbeit war die Verbesserung der visuellen Beurteilung der Schäden. Auf die taktile Beurteilung mittels Tasthaken wurde verzichtet, daher erfolgte die Beurteilung der Knorpelschäden rein optisch.

Bei einer Arbeit zur Genauigkeit der diagnostischen Arthroskopie bei Pferden beobachtete man hingegen, dass unter Standard-Weißlicht gering-gradige Schäden durch fehlende Visualisierung eher unterschätzt und schwere Schäden oft überschätzt wurden [11]. Dies widerspricht den Beobachtungen der Arbeit. Jedoch lässt sich vermuten, dass ein hoher Kontrast in der UV-Arthroskopie zwischen intaktem und defektem Knorpelgewebe dazu führen kann, dass frühe Knorpelschäden stärker visualisiert werden können und dadurch teils im Schweregrad überschätzt werden. Als Beispiel dient Knorpelschaden Nr. fünf

Diskussion

(Abbildung 39, Tabelle 14), der in zwei von drei Fluoreszenzkanälen überschätzt wurde und Grad II statt Grad I zugeordnet wurde. Andererseits ist denkbar, dass höhergradige Schäden aufgrund von schlechter Bildqualität und fehlender Tiefenschärfe im UV-Bild als weniger gravierend wahrgenommen werden können, wie bei Schaden Nr. vier, der in zwei von drei UV-Kanälen zu niedrig klassifiziert wurde (Abbildung 43, Tabelle 16).

Der ALA-Filter wurde bezüglich der Befundungsqualität im Gegensatz zu beiden anderen Filtern unter UV-Licht am häufigsten als „adäquat befundbar“ eingestuft. Trotzdem gab es unter dem ALA/ UV-Kanal die meisten Differenzen zwischen dem in der ASK befundeten Outerbridge-Score und dem histologischen Kontrollergebnis. Trotz schlechter Befundungsqualität des W-Filters unter UV-Licht traten unter W/ UV die wenigsten Differenzen der Klassifikation von Knorpelschäden zwischen ASK und Histologie auf. Folglich hängt die Befundungsqualität nicht zwingend mit der Genauigkeit bei der Klassifikation von Gelenkknorpelschäden zusammen.

Insgesamt traten bei der Auswertung der Differenzen der Outerbridge-Klassifikation zum histologischen Referenzwert keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kanälen auf ($p = 0,874$). Folglich bestand kein Unterschied zwischen der Befundung unter Weiß- und UV-Licht. Beide Arthroskopie-Methoden weisen außerdem eine recht hohe Fehlerquote von einem Drittel auf. Die hohe Fehlerquote könnte unter UV-Licht anteilig der schlechten Bildqualität geschuldet sein. Man kann schlussfolgern, dass selbst der derzeitige Goldstandard zur Klassifikation von Knorpelschäden, die diagnostische Arthroskopie, aufgrund der Subjektivität der Methodik eine hohe Fehlerquote aufweist und neue Methoden notwendig sind [87]. Eine Überlegung wäre, ob statt der ASK die MRT als objektive Messmethode nicht genauer bei der Diagnostik von Gelenkknorpelschäden ist. Bei Untersuchungen von Koch et al. an der 1,5 Tesla MRT hat sich eine hohe Sensitivität aber niedrige Spezifität ergeben [43]. Vor allem die Genauigkeit beim Nachweis niedrig-gradiger Läsionen scheint reduziert. VanBeek et al. fanden in einer Studie zu glenohumeralen Knorpelläsionen heraus, dass Knorpeldefekte ersten und zweiten Grades nach ICRS in bis zu 85 % der Fälle in der nichtkontrastierten MRT nicht gesehen

Diskussion

wurden [96]. Laut Vogt et al. ist in der MRT die Differenzierung zwischen Grad 0, Grad I und Grad II nicht sicher. Zwar sei die Unterscheidung von zweit- und drittgradigen Schäden in der MRT oft möglich, jedoch würde die Größe des Schadens oft unterschätzt werden [98]. Besser scheinen sich T1-gewichtete fettsupprimierende 3D-fast-low-Angle-Shot (FLASH)-MRT-Sequenzen zur Erkennung von Knorpelschäden zu eignen. Recht et al. befundeten unter der Sequenz Läsionen des Patellofemoralgelenks. Für den Nachweis von Knorpelschäden lag die Sensitivität bei 81 % und die Spezifität bei 97 %. Jedoch wurden im Vergleich mit den ASK-Ergebnissen 23 % der Bilder unterschiedlich klassifiziert [73]. Da keine histologischen Referenzwerte erhoben wurden, ist keine Aussage zur Genauigkeit bei der Klassifikation möglich [73]. Zusammenfassend sind die Methoden sowohl in der radiologischen Diagnostik als auch in der ASK verbesserungswürdig, um eine hohe Genauigkeit bei der Klassifikation von Gelenkknorpelschäden zu erreichen.

4.4 Limitationen

In der Studie wurden nur sieben Knie arthroskopiert und davon neun Knorpelschäden weiter untersucht. Um die Reproduzierbarkeit der Studie zu erhöhen, sollte man die Probenanzahl erhöhen. Hinzu kommt, dass es sich bei der begrenzten Anzahl an Knien, die zur Verfügung standen, vor allem um ältere Knie handelte. Der Altersdurchschnitt der Körperspender betrug 76 Jahre. Bei Gelenkknorpel dieses Alters muss man mit altersbedingten arthrotischen Abnutzungserscheinungen rechnen. Die Zielgruppe der verbesserten Diagnostik von Knorpelschäden sind jedoch Menschen mittleren Alters mit isolierten Knorpelschäden ohne fortgeschrittene degenerative Veränderungen. Die Verwendung von Kadaverknien geht jedoch mit älteren Körperspendern und altersentsprechenden Merkmalen einher. Bei zukünftigen Untersuchungen könnte beispielsweise erst in der Arthroskopie entschieden werden, ob das Kadaverknie einen Knorpelschaden aufweist, den es weiter zu untersuchen gilt. Da Körperspenderknie jedoch ein rares und zu würdigendes Gut sind, scheint dies kein praktikabler Ansatz zu sein. Es hat sich gezeigt, dass die verwendeten Filter aufgrund ihres durchgelassenen Spektrums nicht zur Autofluoreszenz-

Diskussion

Arthroskopie geeignet sind. Außerdem umfasste das Anregungslicht nicht das optimal für Kollagen benötigte Spektrum. Daher wäre, nach Optimierung der Lichtquelle und der Filter, ein weiterer möglicher Ansatz die Durchführung bei Patienten in vivo, die präoperativ bereits den hochgradigen Verdacht auf die relevanten Schäden aufweisen.

4.5 Schlussfolgerungen

Sollte man die Autofluoreszenz-Arthroskopie trotz schlechter Ergebnisse weiterhin untersuchen wollen, wären weitere Tests mit an das benötigte Spektrum angepassten Filtern und Lichtquellen nötig. Die in der Arbeit analysierte Inter- und Intra-Rater-Reliabilität waren sehr variabel von gering bis fast perfekt übereinstimmend. Die Variabilität in der Auswertung ist hoch, da die arthroskopische Beurteilung und Klassifikation von Knorpelschäden nach Outerbridge ein deskriptives, subjektives Verfahren ist und stets vom Untersucher abhängt.

Die Befundungsqualität der ausgewerteten Bilder war unter UV-Licht signifikant schlechter. Die Bilder waren in großen Teilen sehr dunkel und unscharf. Falls erneut Versuche durchgeführt werden, sollten die technischen Bedingungen insoweit weiterentwickelt sein, dass eine adäquate Befundung auch unter UV-Licht möglich ist. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die Autofluoreszenz-Arthroskopie unter Verwendung der hier beschriebenen Filter derzeit keine genauere Klassifikation von Knorpelschäden ermöglicht.

5 Zusammenfassung

Je präziser Gelenkknorpelschäden klassifiziert werden, desto zielgerichteter und erfolgreicher kann therapiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Beurteilung von Knorpelschäden unter Autofluoreszenz in der Arthroskopie zu einer genaueren Einteilung führt als in der Standard-Arthroskopie. Es wurden neun Knorpelschäden aus Kadaverknien in der Arthroskopie unter Standard-Weißlicht, sowie unter UV-Licht mit drei verschiedenen Filtern begutachtet und bildlich dokumentiert. Die Aufnahmen wurden von drei Observern in drei Auswertungsrunden hinsichtlich der Befundungsqualität, der Klassifikation nach Outerbridge, der Größe des Schadens und der Darstellung von Fissuren bewertet. Die Inter- und Intraobserverreliabilität wurden bestimmt. Es stellte sich heraus, dass Knorpelschäden unter Weißlicht-Kanälen häufiger adäquat zu befunden waren als unter UV-Licht-Kanälen. Aufgrund von unscharfen und dunklen Aufnahmen unter UV-Licht war die Befundung und Beurteilung unter UV-Licht erschwert, dennoch war ein farblicher Kontrast zwischen intaktem und defektem Knorpelgewebe zu erkennen. Die in der Arbeit analysierte Inter- und Intraobserverreliabilität waren sehr variabel von gering bis fast perfekt übereinstimmend. Um die Genauigkeit der Befundung beider Lichtquellen zu kontrollieren, wurden die Knorpelschäden auf histologischer Ebene nach Outerbridge klassifiziert. Beim Vergleich mit den histologischen Referenzwerten stellte sich keiner der Arthroskopie-Kanäle als signifikant präziser heraus ($p = 0,874$). Bessere Techniken zur Beurteilung von Gelenkknorpelschäden im Knie sind weiterhin erforderlich.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Bandapparat des rechten Knies in Extension von ventral (modifiziert nach: [84]).....	4
Abbildung 2:	Tibiaplateau des linken Knies mit Menisken, Kreuzbändern und Seitenbändern (modifiziert nach: [84]).	4
Abbildung 3:	Aggrekankomplex.	6
Abbildung 4:	Schematische Zonengliederung des Gelenkknorpels.	7
Abbildung 5:	Histologische Aufnahmen von hyalinem Gelenkknorpel des Knies.	8
Abbildung 6:	Terminologie der Knorpelläsionen.	9
Abbildung 7:	Röntgenbefund bei Varusgonarthrose.	20
Abbildung 8:	Darstellung des Stokes-Shift.	23
Abbildung 9:	Übersicht Kadaverpräparation.	29
Abbildung 10:	Übersicht über die Anwendung von Filterkombinationen.	32
Abbildung 11:	Verwendete Arthroskopiegeräte der Firma Storz.	33
Abbildung 12:	Übersicht über die angewendeten Filter am Beispiel des ersten Knorpelschadens.	34
Abbildung 13:	Arthroskopieportale am Kniegelenk (modifiziert nach [32]).	35
Abbildung 14:	Durchführung der Arthroskopie.	35
Abbildung 15:	Ausschnitte aus dem diagnostischen Rundgang durch das linke Knie.....	37
Abbildung 16:	Schablonen der Gelenkflächen des Knies.	38
Abbildung 17:	Knorpelgewinnung für die histologischen Versuche.....	39
Abbildung 18:	Standardisiertes Setting zur Auswertung der Arthroskopiebilder.	40
Abbildung 19:	Schüttler mit Knorpelproben in EDTA-Lösung in Behältern. ...	41
Abbildung 20:	Schneiden der Probe.	42
Abbildung 21:	Anfertigung der Schnitte am Kryotom.	44
Abbildung 22:	DAPI-Färbung und Anfertigung von Präparaten zum Mikroskopieren.....	47
Abbildung 23:	Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops.	48
Abbildung 24:	Erstellung von Mosaikbildern am LSM.	50
Abbildung 25:	Vermessen der Knorpelschäden.....	51
Abbildung 26:	Anzahl befundeter Bilder nach Befundungsqualität.	56
Abbildung 27:	Anzahl befundeter Bilder nach Befundungsqualität pro Kanal.	57
Abbildung 28:	Anzahl befundeter Bilder nach Befundungsqualität pro Observer.	58
Abbildung 29:	Anzahl befundeter Bilder nach Outerbridge-Klassifikation pro Kanal.....	60

Abbildung 30:	Anzahl befundeter Bilder nach Fissuren pro Kanal.	62
Abbildung 31:	Median befundeter Bilder nach Größe in Pixel ² pro Kanal.	63
Abbildung 32:	Anzahl befundeter Bilder nach Outerbridge pro Observer.	65
Abbildung 33:	Anzahl befundeter Bilder nach Fissuren pro Observer.....	66
Abbildung 34:	Median befundeter Bilder nach Größe in Pixel ² pro Observer.	66
Abbildung 35:	Anzahl befundeter Bilder nach Outerbridge pro Observer über zwei Runden.	68
Abbildung 36:	Anzahl befundeter Bilder nach Fissuren pro Observer über zwei Runden.	68
Abbildung 37:	Median befundeter Bilder nach Größe in Pixel ² pro Observer Observer über zwei Runden.	69
Abbildung 38:	Knorpelschaden Nr. 5 histologisch, Grad I.....	71
Abbildung 39:	Knorpelschaden Nr. 5 arthroskopisch (histologisch Grad I). ...	72
Abbildung 40:	Knorpelschaden Nr. 1 histologisch Grad II.....	73
Abbildung 41:	Knorpelschaden Nr. 1 arthroskopisch (histologisch Grad II). ..	74
Abbildung 42:	Knorpelschaden Nr. 4 histologisch Grad III.....	75
Abbildung 43:	Knorpelschaden Nr. 4 arthroskopisch (histologisch Grad III). .	76
Abbildung 44:	Knorpelschaden Nr. 6 histologisch Grad IV.	77
Abbildung 45:	Knorpelschaden Nr. 6 arthroskopisch (histologisch Grad IV)..	78
Abbildung 46:	Anzahl befundeter Bilder nach Outerbridge-Klassifikation pro Kanal und histologische Ergebnisse.	80
Abbildung 47:	Anzahl Bilder nach Differenz zwischen Outerbridge-Score in der ASK und Outerbridge-Score in der Histologie pro Kanal.....	81

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Klassifikation von Knorpelschäden [34] (histologische Abbildungen modifiziert nach [34]).	12
Tabelle 2:	Zusammenfassung der empfohlenen Therapie entsprechend der Klassifikation von Knorpelschäden [99].	18
Tabelle 3:	Klassifikation der Gonarthrose nach Kellgren und Lawrence [41].	19
Tabelle 4:	Häufigkeiten Befundungsqualität.	56
Tabelle 5:	Anzahl befundeter Bilder nach Outerbridge unter Weißlicht und künstlichem grünem Filter.	59
Tabelle 6:	Häufigkeiten Outerbridge.	60
Tabelle 7:	Häufigkeiten Fissuren.	61
Tabelle 8:	Datenanalyse der Größe.	63
Tabelle 9:	Anzahl befundeter Bilder nach Outerbridge unter Standard- und Chroma-Programm.	64
Tabelle 10:	Interraterreliabilität Outerbridge und Fissuren zwischen drei Observern in Runde zwei.	66
Tabelle 11:	Interraterreliabilität der Größe zwischen drei Observern in Runde zwei.	67
Tabelle 12:	Intraraterreliabilität Outerbridge, Fissuren und Größe zwischen drei Observern in Runde zwei.	69
Tabelle 13:	Häufigkeiten Outerbridge histologische Kontrolle.	70
Tabelle 14:	Knorpelschaden Nr. 5. Ergebnisse der Outerbridge-Klassifizierung pro Kanal.	72
Tabelle 15:	Knorpelschaden Nr. 1. Ergebnisse der Outerbridge-Klassifizierung pro Kanal.	73
Tabelle 16:	Knorpelschaden Nr. 4. Ergebnisse der Outerbridge-Klassifizierung pro Kanal.	76
Tabelle 17:	Knorpelschaden Nr. 6. Ergebnisse der Outerbridge-Klassifizierung pro Kanal.	77
Tabelle 18:	Anzahl der nach Outerbridge-Klassifikation richtig und falsch zu hoch/niedrig eingeordneten Arthroskopie-Aufnahmen aller Weiß- und UV-Licht-Kanäle in Bezug auf die histologische Kontrolle	80

Literatur

Literatur

1. Arens C, Reussner D, Woenkhaus J, Leunig A, Betz C S, Glanz H (2007) Indirect fluorescence laryngoscopy in the diagnosis of precancerous and cancerous laryngeal lesions. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 264: 621–626.
2. Ateshian G A, Soslowky L J, Mow V C (1991) Quantitation of articular surface topography and cartilage thickness in knee joints using stereophotogrammetry. *Journal of Biomechanics* 24: 761–776.
3. Aumüller G (2020) *Anatomie*, 5. korrigierte Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
4. Benthien J P, Behrens P (2010) Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis (AMIC): Combining Microfracturing and a Collagen I/III Matrix for Articular Cartilage Resurfacing. *Cartilage* 1: 65–68.
5. Betz C S, Leunig A (2003) Möglichkeiten und Grenzen der Fluoreszenzdiagnostik und photodynamischen Therapie: Teil 1: Fluoreszenzdiagnostik. *HNO* 51: 1019–1035.
6. Bi X, Yang X, Bostrom M P G, Bartusik D, Ramaswamy S, Fishbein K W, Spencer R G, Camacho N P (2007) Fourier transform infrared imaging and MR microscopy studies detect compositional and structural changes in cartilage in a rabbit model of osteoarthritis. *Anal Bioanal Chem* 387: 1601–1612.
7. Blanke F, Vogt S (2019) Regeneration artikulärer Knorpeldefekte am Kniegelenk. *Arthroskopie* 32: 182–186.
8. Blomfield J, Farrar J F (1969) The fluorescent properties of maturing arterial elastin. *Cardiovasc Res* 3: 161–170.
9. Bolm-Audorff U, Braunschweig R, et al. Begutachtungsempfehlung für die Berufskrankheit Begutachtungsempfehlung für die Berufskrankheit Nummer 2112 (Gonarthrose) 2014.
10. Brittberg M, Winalski C S (2003) Evaluation of cartilage injuries and repair. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 85-A Suppl 2: 58–69.
11. Brommer H, Rijkenhuizen A B M, Brama P A J, Barneveld A, van Weeren P R (2004) Accuracy of diagnostic arthroscopy for the assessment of cartilage damage in the equine metacarpophalangeal joint. *Equine veterinary journal* 36: 331–335.
12. Buckwalter J A, Mankin H J (1998) Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instructional course lectures* 47: 477–486.
13. Bunim J J (1956) Arthritis in the elderly patient (osteoarthritis). *Bulletin of the New York Academy of Medicine* 32: 102–115.
14. Chazotte B (2011) Labeling nuclear DNA using DAPI. *Cold Spring Harbor protocols* 2011: pdb.prot5556.

Literatur

15. Chen C T, Burton-Wurster N, Lust G, Bank R A, Tekoppele J M (1999) Compositional and metabolic changes in damaged cartilage are peak-stress, stress-rate, and loading-duration dependent. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 17: 870–879.
16. Curl W W, Krome J, Gordon E, Rushing J, Smith B P, Poehling G G (1997) Cartilage injuries: A review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 13: 456–460.
17. Dreier R (2010) Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders. *Arthritis Res Ther* 12: 216.
18. Endoskope K S (2020) Highlights | KARL STORZ Endoskope. <https://www.karlstorz.com/de/de/highlights-tp.htm> (18.04.2020).
19. Erdmann-Keding M, Ohrndorf S, Werner S G, Glimm A-M, Burmester G-R, Kokolakis G, Zuberbier T, Sterry W, Backhaus M, Philipp S (2019) Fluoreszenzoptische Bildgebung zum Nachweis einer möglichen Psoriasisarthritis im Vergleich zum muskuloskelettalen Ultraschall. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG* 17: 913–922.
20. Eyre D R, Paz M A, Gallop P M (1984) Cross-linking in collagen and elastin. *Annual review of biochemistry* 53: 717–748.
21. Eyre D R, Weis M A, Wu J-J (2006) Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework? *European cells & materials* 12: 57–63.
22. Felson D T, Anderson J J, Naimark A, Walker A M, Meenan R F (1988) Obesity and knee osteoarthritis. The Framingham Study. *Annals of internal medicine* 109: 18–24.
23. Felson D T, Naimark A, Anderson J, Kazis L, Castelli W, Meenan R F (1987) The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis and rheumatism* 30: 914–918.
24. Fujimoto D, Akiba K, Nakamura N (1977) Isolation and characterization of a fluorescent material in bovine achilles tendon collagen. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 76: 1124–1129.
25. Garretson R B, Katolik L I, Verma N, Beck P R, Bach B R, Cole B J (2004) Contact pressure at osteochondral donor sites in the patellofemoral joint. *The American journal of sports medicine* 32: 967–974.
26. Georgakoudi I, Jacobson B C, Müller M G, Sheets E E, Badizadegan K, Carr-Locke D L, Crum C P, Boone C W, Dasari R R, van Dam J, Feld M S (2002) NAD(P)H and collagen as in vivo quantitative fluorescent biomarkers of epithelial precancerous changes. *Cancer research* 62: 682–687.
27. Harrison M H, Schajowicz F, Trueta J (1953) Osteoarthritis of the hip: a study of the nature and evolution of the disease. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 35-B: 598–626.

Literatur

28. Hemmati-Sadeghi S, Ringe J, Dehne T, Haag R, Sittinger M (2018) Hyaluronic Acid Influence on Normal and Osteoarthritic Tissue-Engineered Cartilage. *International journal of molecular sciences* 19.
29. Henao-Murillo L, Ito K, van Donkelaar C C (2018) Collagen Damage Location in Articular Cartilage Differs if Damage is Caused by Excessive Loading Magnitude or Rate. *Ann Biomed Eng* 46: 605–615.
30. Hofmann G O, Marticke J, Grossstück R, Hoffmann M, Lange M, Plettenberg H K W, Braunschweig R, Schilling O, Kaden I, Spahn G (2010) Detection and evaluation of initial cartilage pathology in man: A comparison between MRT, arthroscopy and near-infrared spectroscopy (NIR) in their relation to initial knee pain. *Pathophysiology* 17: 1–8.
31. Imhoff A, Linke R, Baumgartner R (2014) *Checkliste Orthopädie*, 3. Aufl. Georg Thieme Verlag KG, s.l.
32. Imhoff A B, Feucht M J (2017) *Atlas sportorthopädisch-sporttraumatologische Operationen*, 2nd ed. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
33. International Cartilage Repair Society (ICRS) (2020) ICRS Cartilage Injury Evaluation Package 2000. <https://cartilage.org/society/publications/icrs-score/> (09.04.2020).
34. Jackson R. W. (1987) *Memories of Early Days of Arthroscopy*. *The J of Arth a Rel Sur*.
35. Johansson A, Sundqvist T, Kuiper J-H, Öberg P Å (2011) A spectroscopic approach to imaging and quantification of cartilage lesions in human knee joints. *Physics in medicine and biology* 56: 1865–1878.
36. Karg T J, Golic K G (2018) Photoconversion of DAPI and Hoechst dyes to green and red-emitting forms after exposure to UV excitation. *Chromosoma* 127: 235–245.
37. Karl Storz Endoskope (2015) *Urologie*.
38. Karl Storz Endoskope (2019) 20 1336 20-1 Kaltlicht-Fontäne D-LIGHT C, 20 1336 20-133 Kaltlicht-Fontäne D-LIGHT C / AF. *Gebrauchsanweisung*.
39. Karl Storz Endoskope (2019) *Telepräsenz - Bildgebende Systeme, Dokumentation, Beleuchtung, Gerätewagen*.
40. Kellgren J H, Lawrence J S (1957) Radiological assessment of osteoarthrosis. *Annals of the rheumatic diseases* 16: 494–502.
41. Kieser C W, Jackson R W (2001) Severin Nordentoft: The first arthroscopist. *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* 17: 532–535.
42. Kieser C W, Jackson R W (2003) Eugen Bircher (1882–1956) the first knee surgeon to use diagnostic arthroscopy. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 19: 771–776.

Literatur

43. Koch J E J, Ben-Elyahu R, Khateeb B, Ringart M, Nyska M, Ohana N, Mann G, Hetsroni I (2021) Accuracy measures of 1.5-tesla MRI for the diagnosis of ACL, meniscus and articular knee cartilage damage and characteristics of false negative lesions: a level III prognostic study. *BMC Musculoskeletal Disorders* 22: 124.
44. Kohn D (2005) *Knie. 67 Tabellen*. Thieme, Stuttgart.
45. Krishan A, Dandekar P D (2005) DAPI fluorescence in nuclei isolated from tumors. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 53: 1033–1036.
46. Kubitscheck U (2013) *Fluorescence Microscopy. From Principles to Biological Applications*, 1. Aufl. Wiley-Blackwell, s.l.
47. Lagarto J L, Nickdel M B, Kelly D J, Price A, Nanchahal J, Dunsby C, French P, Itoh Y (2020) Autofluorescence Lifetime Reports Cartilage Damage in Osteoarthritis. *Sci Rep* 10: 2154.
48. Lawrence J S, Bremner J M, Bier F (1966) Osteo-arthrosis. Prevalence in the population and relationship between symptoms and x-ray changes. *Annals of the rheumatic diseases* 25: 1–24.
49. (2020) Leica CM1860 UV Kryostat für histopathologische Anwendungen: Leica Biosystems. <https://www.leicabiosystems.com/de/histologiegeraete/gefrierschnitte/leica-cm1860-uv/> (19.04.2020).
50. Lewis W, Padilla-Martinez J-P, Ortega-Martinez A, Franco W (2017) Changes in endogenous UV fluorescence and biomechanical stiffness of bovine articular cartilage after collagenase digestion are strongly correlated. *Journal of biophotonics* 10: 1018–1025.
51. Li X, Martin S, Pitris C, Ghanta R, Stamper D L, Harman M, Fujimoto J G, Brezinski M E (2005) High-resolution optical coherence tomographic imaging of osteoarthritic cartilage during open knee surgery. *Arthritis Res Ther* 7: R318-23.
52. Link T M, Stahl R, Woertler K (2007) Cartilage imaging: motivation, techniques, current and future significance. *Eur Radiol* 17: 1135–1146.
53. Lutz V, Sattler M, Gallinat S, Wenck H, Poertner R, Fischer F (2012) Impact of collagen crosslinking on the second harmonic generation signal and the fluorescence lifetime of collagen autofluorescence. *Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)* 18: 168–179.
54. Manning H B, Nickdel M B, Yamamoto K, Lagarto J L, Kelly D J, Talbot C B, Kennedy G, Dudhia J, Lever J, Dunsby C, French P, Itoh Y (2013) Detection of cartilage matrix degradation by autofluorescence lifetime. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 32: 32–38.

Literatur

55. Mark K von der, Glückert K (1990) Biochemische und molekularbiologische Aspekte zur Früherfassung humaner Arthrosen. *Der Orthopade* 19: 2–15.
56. Marlovits S, Kutscha-Lissberg F, Aldrian S, Resinger C, Singer P, Zeller P, Vécsei V (2004) Autologe Chondrozytentransplantation zur Behandlung von Knorpeldefekten des Kniegelenks. Techniken und Ergebnisse. *Der Radiologe* 44: 763–772.
57. Maroudas A I (1976) Balance between swelling pressure and collagen tension in normal and degenerate cartilage. *Nature* 260: 808–809.
58. Menashe L, Hirko K, Losina E, Kloppenburg M, Zhang W, Li L, Hunter D J (2012) The diagnostic performance of MRI in osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis and cartilage* 20: 13–21.
59. Monici M (2005) Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. In: El-Gewely M R (Hrsg.) *Biotechnology annual review*. vol. 11. Elsevier, Amsterdam, New York, S. 227–256.
60. Nguyen D T, van Horssen P, Derriks H, van de Giessen M, van Leeuwen T (2017) Autofluorescence imaging for improved visualization of joint structures during arthroscopic surgery. *J EXP ORTOP* 4: 19.
61. Niedermayr A. (2014) LP – Fluoreszenzmikroskopie. <https://lp.uni-goettingen.de/get/text/6741> (09.04.2020).
62. Niemeyer P, Andereya S, Angele P, Ateschrang A, Aurich M, Baumann M, Behrens P, Bosch U, Erggelet C, Fickert S, Fritz J, Gebhard H, Gelse K, Günther D, Hoberg A, Kasten P, Kolombe T, Madry H, Marlovits S, Meenen N M, Müller P E, Nöth U, Petersen J P, Pietschmann M, Richter W, Rolauffs B, Rhunau K, Schewe B, Steinert A, Steinwachs M R, Welsch G H, Zinser W, Albrecht D (2013) Stellenwert der autologen Chondrozytentransplantation (ACT) in der Behandlung von Knorpelschäden des Kniegelenks - Empfehlungen der AG Klinische Geweberegeneration der DGOU. *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie* 151: 38–47.
63. Niethard F U, Pfeil J, Biberthaler P (2017) *Orthopädie und Unfallchirurgie*, 8. unveränderte Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, Delhi.
64. Nordentoft S. (1912) Ueber Endoskopie geschlossener Cavitäten mittels meines Trokart-Endoskopes. *Dtsch Chir*: 78–81.
65. Nuki G (1999) Osteoarthritis: a problem of joint failure. *Zeitschrift für Rheumatologie* 58: 142–147.
66. Outerbridge R E (1961) The etiology of chondromalacia patellae. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 43-B: 752–757.
67. Pennington R G C, Bottomley N J, Neen D, Brownlow H C (2008) Radiological features of osteoarthritis of the acromioclavicular joint and its association with clinical symptoms. *Journal of orthopaedic surgery (Hong Kong)* 16: 300–302.

Literatur

68. Peyron J G (1979) Epidemiologic and etiologic approach of osteoarthritis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 8: 288–306.
69. Prakash M, Joukainen A, Tornainen J, Honkanen M K M, Rieppo L, Afara I O, Kröger H, Töyräs J, Sarin J K (2019) Near-infrared spectroscopy enables quantitative evaluation of human cartilage biomechanical properties during arthroscopy. *Osteoarthritis and cartilage* 27: 1235–1243.
70. Quatman C E, Hettrich C M, Schmitt L C, Spindler K P (2011) The clinical utility and diagnostic performance of magnetic resonance imaging for identification of early and advanced knee osteoarthritis: a systematic review. *The American journal of sports medicine* 39: 1557–1568.
71. Rasso J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R (2016) *Biochemie*, 4. Auflage. Thieme, Stuttgart.
72. Rath B, Eschweiler J, Betsch M, Gruber G (2017) Knorpelreparative Eingriffe am Kniegelenk. *Der Orthopäde* 46: 919–927.
73. Recht M P, Piraino D W, Paletta G A, Schils J P, Belhobek G H (1996) Accuracy of fat-suppressed three-dimensional spoiled gradient-echo FLASH MR imaging in the detection of patellofemoral articular cartilage abnormalities. *Radiology* 198: 209–212.
74. Rehnitz C, Weber M-A (2015) Morphologische und funktionelle Knorpeldiagnostik. *Der Orthopäde* 44: 317-33; quiz 334-5.
75. Richards-Kortum R, Sevick-Muraca E (1996) Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis. *Annual review of physical chemistry* 47: 555–606.
76. Roemer F W, Crema M D, Trattnig S, Guermazi A (2011) Advances in imaging of osteoarthritis and cartilage. *Radiology* 260: 332–354.
77. Sarin J K, Te Moller N C R, Mancini I A D, Brommer H, Visser J, Malda J, van Weeren P R, Afara I O, Töyräs J (2018) Arthroscopic near infrared spectroscopy enables simultaneous quantitative evaluation of articular cartilage and subchondral bone in vivo. *Scientific reports* 8: 13409.
78. Schenke-Layland K (2008) Non-invasive multiphoton imaging of extracellular matrix structures. *Journal of biophotonics* 1: 451–462.
79. Schiebler T H, Korf H-W (2007) *Anatomie. Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie: unter Berücksichtigung des Gegenstandskatalogs: [e-learning www.schieblerkorf.de, 10. vollst. überarb. Aufl. Steinkopff, Darmstadt.*
80. Schmitt R, Lanz U (2015) *Bildgebende Diagnostik der Hand*, 3. vollst. überarb. und erw. Aufl. Thieme, Stuttgart.
81. Schmitz S, Desel C (2018) *Der Experimentator Zellbiologie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
82. Schomacker K T, Frisoli J K, Compton C C, Flotte T J, Richter J M, Nishioka N S, Deutsch T F (1992) Ultraviolet laser-induced fluorescence

Literatur

- of colonic tissue: basic biology and diagnostic potential. *Lasers in surgery and medicine* 12: 63–78.
83. Schünke M (2018) *Topografie und Funktion des Bewegungssystems. Funktionelle Anatomie für Physiotherapeuten*, 3. unveränderte Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
 84. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K (2018) *Prometheus - LernAtlas der Anatomie. Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem*, 5. überarbeitete und erweiterte Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
 85. Shuckett R, Malemud C J (1990) Distinct cartilage proteoglycan chromatographic elution patterns in advanced human hip osteoarthritis: correlations with histologic analysis. *The Journal of rheumatology* 17: 357–363.
 86. Spahn G, Klinger H M, Baums M, Hoffmann M, Plettenberg H, Kroker A, Hofmann G O (2010) Near-infrared spectroscopy for arthroscopic evaluation of cartilage lesions: results of a blinded, prospective, interobserver study. *The American journal of sports medicine* 38: 2516–2521.
 87. Spahn G, Klinger H M, Baums M, Pinkepank U, Hofmann G O (2011) Reliability in arthroscopic grading of cartilage lesions: results of a prospective blinded study for evaluation of inter-observer reliability. *Arch Orthop Trauma Surg* 131: 377–381.
 88. Spahn G, Plettenberg H, Nagel H, Kahl E, Klinger H M, Mückley T, Günther M, Hofmann G O, Mollenhauer J A (2008) Evaluation of cartilage defects with near-infrared spectroscopy (NIR): an ex vivo study. *Medical engineering & physics* 30: 285–292.
 89. Squires G R, Okouneff S, Ionescu M, Poole A R (2003) The pathobiology of focal lesion development in aging human articular cartilage and molecular matrix changes characteristic of osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism* 48: 1261–1270.
 90. Stenzl A, Burger M, Fradet Y, Mynderse L A, Soloway M S, Witjes J A, Kriegmair M, Karl A, Shen Y, Grossman H B (2010) Hexaminolevulinate guided fluorescence cystoscopy reduces recurrence in patients with nonmuscle invasive bladder cancer. *The Journal of urology* 184: 1907–1913.
 91. Stokes G. G. (1853) XVI. On the change of refrangibility of light.—No. II. *Phil. Trans. R. Soc.* 143: 385–396.
 92. Stöve J (2018) *S2k-Leitlinie Gonarthrose*. Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie (DGOOC).
 93. Tanious F A, Veal J M, Buczak H, Ratmeyer L S, Wilson W D (1992) DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry* 31: 3103–3112.

Literatur

94. Thambyah A, Zhao J-Y, Bevill S L, Broom N D (2012) Macro-, micro- and ultrastructural investigation of how degeneration influences the response of cartilage to loading. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 5: 206–215.
95. Vahlensieck M, Reiser M (2015) MRT des Bewegungsapparats, 4. vollst. überarb. und erw. Aufl. Thieme, Stuttgart.
96. VanBeek C, Loeffler B J, Narzikul A, Gordon V, Rasiej M J, Kazam J K, Abboud J A (2014) Diagnostic accuracy of noncontrast MRI for detection of glenohumeral cartilage lesions: a prospective comparison to arthroscopy. *Journal of shoulder and elbow surgery* 23: 1010–1016.
97. Virén T, Saarakkala S, Kaleva E, Nieminen H J, Jurvelin J S, Töyräs J (2009) Minimally invasive ultrasound method for intra-articular diagnostics of cartilage degeneration. *Ultrasound in Medicine & Biology* 35: 1546–1554.
98. Vogt S, Braun S, Imhoff A B (2007) Stadiengerechte operative Knorpeltherapie. Aktueller Stand. *Zeitschrift für Rheumatologie* 66: 493-503; quiz 504.
99. Vries S A H de, van Turnhout M C, Oomens C W J, Erdemir A, Ito K, van Donkelaar C C (2014) Deformation thresholds for chondrocyte death and the protective effect of the pericellular matrix. *Tissue engineering. Part A* 20: 1870–1876.
100. Waine H, Nevinny D, Rosenthal J, Joffe I B (1961) Association of osteoarthritis and diabetes mellitus. *Tufts folia medica* 7: 13–19.
101. Waldt S, Eiber M, Wörtler K (2017) Messverfahren und Klassifikationen in der muskuloskelettalen Radiologie. 75 Tabellen, 2. unveränderte Aufl. Thieme, Stuttgart.
102. Waqas M, Khan I, Shamim M S (2017) Role of 5-ALA in improving extent of tumour resection in patients with Glioblastoma Multiforme. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association* 67: 1630–1632.
103. Werner S, Langer H-E (2017) Fluoreszenzoptische Bildgebung. *Akt Rheumatol* 42: 423–431.
104. Wright V (1990) Post-traumatic osteoarthritis--a medico-legal minefield. *British journal of rheumatology* 29: 474–478.
105. Wunder A, Grimm J, Müller-Ladner U (2003) Molekulare Bildgebung bei rheumatoider Arthritis. *Zeitschrift für Rheumatologie* 62: 1133-6.
106. Zak L, Albrecht C, Wondrasch B, Widhalm H, Veksler G, Trattinig S, Marlovits S, Aldrian S (2014) Results 2 Years After Matrix-Associated Autologous Chondrocyte Transplantation Using the Novocart 3D Scaffold: An Analysis of Clinical and Radiological Data. *The American journal of sports medicine* 42: 1618–1627.
107. Zellner J, Angele P (2019) Osteochondrale Rekonstruktion artikulärer Defekte. *Arthroskopie* 32: 187–192.

Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der orthopädischen Universitätsklinik Tübingen unter Betreuung von Herrn Professor Dr. med. Hofmann durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. med. Dahlheimer, Oberarzt und Herrn Dr. med. Mederake, Assistenzarzt der Klinik.

Die Versuche des arthroskopischen Teils im Biomechanik-Labor wurden in gemeinsamer Arbeit von Herrn Dr. med. Dahlheimer, Herrn Dr. med. Mederake, Herrn Vaas, Herrn Jakob und mir durchgeführt. Die Präparation der Knie wurde durch Herrn Jakob, Herrn Dr. med. Mederake und Herrn Vaas vorgenommen.

Die Arthroskopien wurden von Herrn Dr. med. Mederake und Herrn Vaas durchgeführt. Sämtliche Versuche des histologischen Teils im Zelllabor wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch Herrn Prof. Dr. med. Hofmann durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Korrekturen von Herrn Prof. Dr. med. Hofmann, Herrn Dr. med. Dahlheimer und Herrn Dr. med. Mederake verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 01.03.2022

Vivien Scheibe

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. U. Hofmann für die großartige Betreuung und Unterstützung während der gesamten Arbeit bedanken. Seine große Erfahrung bei wissenschaftlichen Arbeiten war mir eine bedeutende Hilfe. Bei meinen Betreuern, Herrn Dr. med. P. Dahlheimer und Herrn Dr. med. M. Mederake möchte ich mich besonders bedanken. Sie haben gemeinsam mit der Firma Storz die Idee einer neuen Visualisierungsmethode von Knorpelschäden bei Arthroscopien entwickelt und mir das Thema großzügigerweise überlassen. Einen großen Dank auch an die Mitarbeiter von Storz für die Bereitstellung der Arthroscopiegeräte und die Unterstützung der Studie während der Pandemie. Vielen Dank an Herrn Daniel Vaas, der den Großteil der Arthroscopien selbst durchgeführt hat und sich gemeinsam mit Herrn Dr. med. P. Dahlheimer und Herrn Dr. med. M. Mederake die Zeit genommen hat, die Arthroscopie-Bilder auszuwerten. Ebenfalls unverzichtbar bei den Versuchen war Herr Christopher Jakob. Ich möchte allen für die gute Laune und die Freude an der Arbeit danken. Dank der tollen Organisation war die Ausübung des praktischen Parts im Biomechanik-Labor erst möglich.

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Dr. med. M. Mederake bedanken. Ich hätte mir eine bessere Betreuung nicht wünschen können. Die Mühe und Zeit, die er stets investiert hat, sind bemerkenswert. Sein Engagement hat deutlich dazu beigetragen, die Arbeit voranzutreiben. Ich bedanke mich für die tolle Zusammenarbeit.

Für die herzliche Arbeitsatmosphäre und große Hilfsbereitschaft im Zelllabor möchte ich mich bei Frau Marina Danalache und allen Mitarbeitern und Doktoranden im Labor bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie. Meine Mutter hat mich während der Doktorarbeit und des Studiums und darüber hinaus immer unterstützt und ermutigt. Sie hat mich stets aufgebaut und war eine hilfreiche Testleserin. Zuletzt möchte ich mich bei meinem Freund Philip bedanken. Er war stets für mich da und hat mich bei der Arbeit aufgeheitert und unterstützt.