

Aus der Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik
Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie an der
Universität Tübingen

Frühdiagnose lokaler, struktureller Schäden der
Gelenkoberflächen humaner Femurkondylen anhand
fluoreszenzmikroskopisch-räumlicher Analysen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Böhme, Klaus Martin

2020

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. B. Rolauffs

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. F. Traub, Ph.D.

Tag der Disputation: 15.06.2020

Für Eva

und unsere Kinder

Gliederung

- I Inhaltsverzeichnis
- II Abbildungsverzeichnis
- III Tabellenverzeichnis
- IV Abkürzungsverzeichnis
- 1. Einleitung
- 2. Material und Methoden
- 3. Ergebnisse
- 4. Diskussion
- 5. Zusammenfassung
- 6. Literaturverzeichnis
- 7. Eigenanteilserklärung
- 8. Danksagung

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis.....	5
II	Abbildungsverzeichnis	7
III	Tabellenverzeichnis	19
IV	Abkürzungsverzeichnis	21
1.	Einleitung	23
1.1	Osteoarthrose	23
1.2	Anatomie.....	26
1.2.1	Anatomie des menschlichen Kniegelenks	26
1.2.2	Der hyaline Gelenkknorpel	27
1.2.2.1	Die räumliche Organisation der superfiziellen Chondrozyten des hyalinen Gelenkknorpels	32
1.3	Veränderungen des hyalinen Gelenkknorpels bei Osteoarthrose	34
1.4	Aktuelle Diagnostik und Therapie von Knorpelschäden des Knies	38
1.5	Das Ziel der Arbeit	41
2.	Material und Methoden	42
2.1	Probenmaterial.....	42
2.2	Geräte.....	43
2.3	Verbrauchsmaterialien	43
2.4	Chemikalien und Reagenzien	44
2.5	Software.....	44
2.6	Methoden.....	45
2.6.1	Workflow – Schema.....	45
2.6.2	Gewinnung der Proben und Makroskopisch Visuelle Klassifizierung des Schadigungsgrades	45
2.6.3	Nukleusfärbung	48
2.6.4	Fluoreszenzmikroskopie der Knorpelproben	49
2.6.5	Rasterelektronenmikroskopie der Knorpelproben.....	53
2.6.6	Aufarbeiten der Fluoreszenz- und Elektronen-Mikroskopischen Aufnahmen einer Probe.....	54
2.6.7	Gewinnung der Daten.....	59
2.6.7.1	Elektronenmikroskopische Bildanalyse.....	59
2.6.7.2	Fluoreszenzmikroskopische Bildanalyse	62

2.6.8	Statistische Auswertung	65
2.6.8.1	Lokale, Kachel-basierte Analyse	66
2.6.8.2	Globale, Proben-basierte Analyse	66
3.	Ergebnisse	67
3.1	Makroskopisch-visuelle Einteilung der Schädigung des Knorpelgewebes... 67	
3.2	Probenspezifische rasterelektronen- und fluoreszenzmikroskopische Darstellung und Klassifikation	69
3.3	Analyse signifikanter Unterschiede und Korrelationen der einzelnen optisch- visuellen Klassifikationen („Scores“)	89
3.4	Ergebnisse mit Darstellung signifikanter Unterschiede nach Texturanalyse der REM-Bilder	97
3.5	Analyse signifikanter Korrelationen zwischen den einzelnen Parametern nach Texturanalyse der REM-Bilder	108
3.6	Ergebnisse und Darstellung signifikanter Unterschiede zwischen quantitativen Parametern der räumlichen Organisation	113
3.7	Analyse signifikanter Korrelationen zwischen quantitativen Parametern der räumlichen Organisation	140
3.8	Analyse signifikanter Korrelationen zwischen der Texturanalyse der REM- Bilder und den optisch-visuellen Klassifikationen (Scores)	154
3.9	Analyse signifikanter Korrelationen zwischen quantitativen Parametern der räumlichen Organisation und den optisch-visuellen Klassifikationen (Scores)	163
3.10	Analyse signifikanter Korrelationen zwischen der Texturanalyse der REM- Bilder und quantitativen Parametern der räumlichen Organisation	178
3.11	Auswahl eines Panels an quantitativen und qualitativen Parametern zur Analyse der räumlichen Organisation	187
3.12	Testsystem für früh-osteoarthritische Veränderungen	188
3.13	Veränderungen der Organisation der superfiziellen Chondrozyten trotz REM- intakter Knorpelproben-Oberflächen	189
4.	Diskussion.....	192
5.	Zusammenfassung.....	204
6.	Literatur-Verzeichnis	205
7.	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	214
8.	Danksagung.....	215

II **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1:	Rechtes Kniegelenk mit Bändern und Menisken von vorne	27
Abbildung 2:	Histolog. Schema der drei Knorpelarten.....	29
Abbildung 3:	Schema der zonalen Zellausrichtung entlang der Kollagen-Arkaden im Hyalinen Knorpel	29
Abbildung 4:	Hyaliner Knorpel, Histologische Schnitte.....	30
Abbildung 5:	Aufbau der Matrix des Hyalinen Knorpelgewebes.....	31
Abbildung 6:	Verschiedene Zell-Muster der Chondrozyten in der superfiziellen Zone	33
Abbildung 7:	Ansicht des Knorpels einer gesunden Femurcondyle und sichtbare Veränderungen des Knorpelüberzugs bei Arthrose.....	35
Abbildung 8:	3D-Rekonstruktion der Veränderung der Chondrozytenorganisation	37
Abbildung 9:	Humanes Knie intraoperativ vor distalem Sägeschnitt der Femurcondylen.....	46
Abbildung 10:	Condylen in DMEM-Lösung im Transportbehälter	46
Abbildung 11:	Femurcondylen bei makroskopisch-visueller Betrachtung	47
Abbildung 12:	Ausgeschnittene Knorpelprobe in Form eines rechtwinkligen Trapezes	48
Abbildung 13:	Prinzip der Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie	50
Abbildung 14:	Schema 3D Datengewinnung und Auswertung.....	51
Abbildung 15:	Z-Stack Bilder 3, 17 und 30 von 37 der Probe ADC1	52
Abbildung 16:	Übersichtsbild Probe ADC1	52
Abbildung 17:	Schematisches Prinzip der Raster-Elektronen-Mikroskopie.....	53
Abbildung 18:	REM-Panorama der Probe UZA1	54
Abbildung 19:	Ausgangs-REM-Bild der Oberfläche einer Knorpelprobe	55
Abbildung 20:	Markierung der Grenzen der Probenoberfläche	55
Abbildung 21:	Übereinanderlagerung der REM- und der Fluoreszenz- mikroskopischen Ebenen	56
Abbildung 22:	Einzeichnung von „Regions-of-interest“	57
Abbildung 23:	Nummerierung der Kacheln	57

Abbildung 24:	Ausschneiden einer einzelnen Kachel für die subsequente Analyse	58
Abbildung 25:	Übereinander liegende Elektronen- und Fluoreszenzmikroskopische Bildinformation einer Kachel.....	58
Abbildung 26:	Separierte Elektronen- und Fluoreszenzmikroskopische Bildinformation der gleichen Kachel	59
Abbildung 27:	Globale REM-Aufnahme der drei verschiedene REM-Schweregrade der Schädigung	60
Abbildung 28:	Bestimmung der besten Markierung der Zellkerne.....	63
Abbildung 29:	Darstellung der Zellkerne in einem xy-Koordinatensystem	63
Abbildung 30:	Anzahl der gewonnenen Proben je Schädigungsgrad in der Makroskopisch-visuellen Einteilung des Knorpelschadens	68
Abbildung 31:	Stadien der Chondrozyten-Organisation nach Felka.....	70
Abbildung 32:	Rasterelektronen-mikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe UZA1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen	71
Abbildung 33:	Rasterelektronen-mikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe ADB1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen	72
Abbildung 34:	Rasterelektronen-mikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe HSA1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen.	73
Abbildung 35:	Rasterelektronen-mikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe MRA1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen.	74
Abbildung 36:	Rasterelektronen-mikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe ADC1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen.	75
Abbildung 37:	Rasterelektronen-mikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe HSB1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen.	76
Abbildung 38:	Rasterelektronen-mikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe EHA1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen.	77

Abbildung 39:	Rasterelektronen-mikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe ESA1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen.	78
Abbildung 40:	Rasterelektronen-mikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe LKA1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen.	79
Abbildung 41:	Rasterelektronen-mikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe HSC1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen.	80
Abbildung 42:	Rasterelektronen-mikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe UZB1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen.	81
Abbildung 43:	Rasterelektronen-mikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe LKB1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen.	82
Abbildung 44:	Rasterelektronen-mikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe MRB1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen.	83
Abbildung 45:	Rasterelektronen-mikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe EHB1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen.	84
Abbildung 46:	Rasterelektronen-mikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe UZC1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen.	85
Abbildung 47:	Rasterelektronen-mikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe MRC1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen.	86
Abbildung 48:	Rasterelektronen-mikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe EHC1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen.	87
Abbildung 49:	Rasterelektronen-mikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe LKC1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen.	88
Abbildung 49:	Unterschiede im lokalen, kachel-bezogenen REM-visuellen Grad der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.	90

Abbildung 50:	Unterschiede im lokalen, kachel-bezogenen REM-visuellen Grad der lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.	91
Abbildung 51:	Unterschiede im Makroskopisch-visuellen Grad der Schädigung der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.	92
Abbildung 52:	Unterschiede im Makroskopisch-visuellen Grad der Schädigung der lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.	93
Abbildung 53:	Unterschiede im globalen Pattern der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.	94
Abbildung 54:	Unterschiede im lokalen Pattern der isolieren, lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.	95
Abbildung 55:	Unterschiede im globalen Angular Second Moment der Textur-analysierten REM-Aufnahmen der gesamten Probenoberflächen in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.	98
Abbildung 56:	Unterschiede im lokalen Angular Second Moment der Textur-analysierten REM-Aufnahmen der lokalen Probenoberfläche-Kacheln in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.	99
Abbildung 57:	Unterschiede im globalen Contrast der Textur-analysierten REM-Aufnahmen der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.	100
Abbildung 58:	Unterschiede im Contrast der Textur-analysierten REM-Aufnahmen der lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.	101
Abbildung 59:	Unterschiede in der globalen Correlation der Textur-analysierten REM-Aufnahmen der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.	102
Abbildung 60:	Unterschiede in der lokalen Correlation der Textur-analysierten REM-Aufnahmen der lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.	103
Abbildung 61:	Unterschiede globalen im Inverse Difference Moment (IDM) der Textur-analysierten REM-Aufnahmen der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.	104

Abbildung 62:	Unterschiede im lokalen Inverse Difference Moment (IDM) der Textur-analysierten REM-Aufnahmen der lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation	105
Abbildung 63:	Unterschiede in der globalen Entropie der Textur-analysierten REM-Aufnahmen der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.....	106
Abbildung 64:	Unterschiede in der lokalen Entropie der Textur-analysierten REM-Aufnahmen der lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.....	107
Abbildung 65:	Punktwolken-Diagramm von ASM und Contrast (oben), ASM und Correlation (mittig) sowie ASM und IDM (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse.....	110
Abbildung 66:	Punktwolken-Diagramm von ASM und Entropie (oben), Contrast und Correlation (mittig) und Contrast und IDM (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse.....	111
Abbildung 67:	Punktwolken-Diagramm von Correlation und Entropie (oben), Correlation und IDM (mittig) sowie Correlation und Entropie (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse	112
Abbildung 68:	Punktwolken-Diagramm von IDM und Entropie als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse.....	113
Abbildung 69:	Unterschiede in der globalen MedianNND der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.	114
Abbildung 70:	Unterschiede in der lokalen MedianNND der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der isolieren, lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.	115
Abbildung 71:	Unterschiede im globalen MedianDegree der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.	116

Abbildung 72:	Unterschiede im lokalen MedianDegree der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der isolieren, lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation	117
Abbildung 73:	Unterschiede im globalen MWNND der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.....	118
Abbildung 74:	Unterschiede im lokalen MWNND der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der isolieren, lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation	119
Abbildung 75:	Unterschiede im globalen MWDegree der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.....	120
Abbildung 76:	Unterschiede im lokalen MWDegree der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der isolieren, lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.	121
Abbildung 77:	Unterschiede in der globalen Standard Deviance of Clark-Evans (SDofCE) der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.	122
Abbildung 78:	Unterschiede in der lokalen Standard Deviance of Clark-Evans (SDofCE) der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der isolieren, lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.....	123
Abbildung 79:	Unterschiede in der globalen absoluten Zellzahl der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.	124
Abbildung 80:	Unterschiede in der lokalen absoluten Zellzahl der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der isolieren, lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.	125
Abbildung 81:	Unterschiede in der globalen normierten Zellzahl der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.	126

Abbildung 82:	Unterschiede in der lokalen normierten Zellzahl der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der isolieren, lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.	127
Abbildung 83:	Unterschiede im globalen xPairColMax der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.	128
Abbildung 84:	Unterschiede im lokalen xPairColMax der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der isolieren, lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.	129
Abbildung 85:	Unterschiede im globalen PairColMax der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.	130
Abbildung 86:	Unterschiede im lokalen PairColMax der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der isolieren, lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.	131
Abbildung 87:	Unterschiede im globalen Clark-Evans-Index with Edges (CEwEdges) der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.	132
Abbildung 88:	Unterschiede im lokalen Clark-Evans-Index with Edges (CEwEdges) der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der isolieren, lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.	133
Abbildung 89:	Unterschiede im globalen MWDegreeNN der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.	134
Abbildung 90:	Unterschiede im lokalen MWDegreeNN der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der isolieren, lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.	135
Abbildung 91:	Unterschiede im globalen MedianDegreeNN der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.	136

- Abbildung 92: Unterschiede im lokalen MedianDegreeNN der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der isolieren, lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der globalen visuellen REM-Klassifikation.137
- Abbildung 93: Punktwolken-Diagramm von MedianNND und MittelwertNND (oben), MedianDegree und MittelwertDegree (mittig) sowie MedianDegree und MittelwertDegreeNN (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse142
- Abbildung 94: Punktwolken-Diagramm von MedianDegree und MedianDegreeNN (oben), MedianNND und SDofCE (mittig) und MedianNND und Abs.Zellzahl (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse.143
- Abbildung 95: Punktwolken-Diagramm von MedianNND und Norm.Zellzahl (oben), MedianNND und xPairColMax (mittig) sowie MedianNND und CEwEdges (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse144
- Abbildung 96: Punktwolken-Diagramm von MWNNND und SDofCE (oben), MWNNND und Abs.Zellzahl (mittig) sowie MWNNND und Norm.Zellzahl (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse.145
- Abbildung 97: Punktwolken-Diagramm von MWNNND und xPairColMax (oben) MWNNND und CEwEdges (mittig) sowie MWDegree und MWDegreeNN (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse.146
- Abbildung 98: Punktwolken-Diagramm von MWDegree und MedianDegreeNN (oben), SDofCE und abs.Zellzahl (mittig) sowie SDofCE und norm.Zellzahl (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse.147
- Abbildung 99: Punktwolken-Diagramm von SDofCE und xPairColMax (oben), SDofCE und PairColMax (mittig) sowie SDofCE und CEwEdges (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse148
- Abbildung 100: Punktwolken-Diagramm von abs.Zellzahl und norm.Zellzahl (oben), abs.Zellzahl und xPairColMax (mittig) sowie abs.Zellzahl und PairColMax (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse.149

- Abbildung 101: Punktwolken-Diagramm von sowie abs.Zellzahl und CEwEdges (oben), norm.Zellzahl und xPairColMax (mittig) sowie norm.Zellzahl und CEwEdges (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse. 150
- Abbildung 102: Punktwolken-Diagramm von xPairColMax und PairColMax (oben) sowie xPairColMax und CEwEdges (mittig) sowie PairColMax und CEwEdges (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse. 151
- Abbildung 103: Punktwolken-Diagramm von PairColMax und MWDegreeNN (oben), MWDegreeNN und MedianDegreeNN (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse. 152
- Abbildung 104: Punktwolken-Diagramm von MedianNND und xPairColMax (oben) sowie MWNND und xPairColMax (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der global-Proben-basierten Analyse. 153
- Abbildung 105: Punktwolken-Diagramm von norm.Zellzahl und xPairColMax als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der global-Proben-basierten Analyse. 154
- Abbildung 106: Punktwolken-Diagramm von ASM und REM global sowie von ASM und REM lokal (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse. 156
- Abbildung 107: Punktwolken-Diagramm von makroskopisch-visuell (oben), ASM und Pattern (mittig) sowie Contrast und REM global (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse. 157
- Abbildung 108: Punktwolken-Diagramm von Contrast und REM lokal (oben) sowie Contrast und Pattern (mittig) sowie Correlation und REM global (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse. 158
- Abbildung 109: Punktwolken-Diagramm von Correlation und REM lokal (oben), Correlation und Pattern (mittig) sowie IDM und REM global (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse. 159
- Abbildung 110: Punktwolken-Diagramm von IDM und REM lokal (oben) sowie IDM makroskopisch-visuell (mittig) sowie IDM und Pattern (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse. 160

Abbildung 111: Punktwolken-Diagramm von Entropie und REM global (oben), Entropie und REM lokal (mittig) sowie Entropie und makroskopisch-visuell (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse.	161
Abbildung 112: Punktwolken-Diagramm von Entropie und Pattern als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse.....	162
Abbildung 113: Punktwolken-Diagramm von MedianNND und REM global (oben) sowie MedianNND und REM lokal (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse	165
Abbildung 114: Punktwolken-Diagramm von MedianNND und Pattern (oben), MedianDegree und REM global (mittig) sowie MedianDegree und makroskopisch-visuell (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse.	166
Abbildung 115: Punktwolken-Diagramm von MWNNND und REM global (oben) sowie MWNNND und REM-lokal (mittig) sowie MWNNND und makroskopisch-visuell (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse.	167
Abbildung 116: Punktwolken-Diagramm von MWNNND und Pattern (oben), MWDegree und REM global (mittig) sowie MWDegree und makroskopisch-visuell (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse.	168
Abbildung 117: Punktwolken-Diagramm von MWDegree und Pattern (oben) sowie SDofCE und REM global (mittig) sowie SDofCE und REM lokal (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse.	169
Abbildung 118: Punktwolken-Diagramm von SDofCE und makroskopisch-visuell (oben), SDofCE und Pattern (mittig) sowie abs. Zellzahl und REM global (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse.	170
Abbildung 119: Punktwolken-Diagramm von abs.Zellzahl und REM lokal (oben), abs. Zellzahl und makroskopisch-visuell (mittig) sowie abs.Zellzahl und Pattern (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse.	171
Abbildung 120: Punktwolken-Diagramm von norm. Zellzahl und REM global (oben), norm.Zellzahl und REM lokal (mittig) sowie norm. Zellzahl und makroskopisch-visuell (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse	172

- Abbildung 121: Punktwolken-Diagramm von norm.Zellzahl und Pattern (oben), xPairColMax und makroskopisch-visuell (mittig) sowie PairColMax und REM global (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse.173
- Abbildung 122: Punktwolken-Diagramm von PairColMax und REM lokal (oben), PairColMax und makroskopisch-visuell (mittig) sowie CEwEdges und REM global (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse.174
- Abbildung 123: Punktwolken-Diagramm von CEwEdges und REM lokal (oben), CEwEdges und makroskopisch-visuell (mittig) sowie CEwEdges und Pattern (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse.175
- Abbildung 124: Punktwolken-Diagramm MWDegreeNN und makroskopisch-visuell (oben), MedianDegreeNN und REM global (mittig) sowie MedianDegreeNN und makroskopisch-visuell (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse.....176
- Abbildung 125: Punktwolken-Diagramm MedianDegreeNN und REM lokal (oben) sowie MedianDegreeNN und Pattern (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse177
- Abbildung 126: Punktwolken-Diagramm von ASM und MedianNND als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse.....179
- Abbildung 127: Punktwolken-Diagramm von ASM mit MittelwertNND (oben), ASM und SDofCE (mittig) sowie ASM mit abs.Zellzahl (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse.....180
- Abbildung 128: Punktwolken-Diagramm von Contrast mit ASM und norm.Zellzahl (oben), SDofCE (mittig) sowie Contrast und abs.Zellzahl (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse.....181
- Abbildung 129: Punktwolken-Diagramm von Contrast mit norm.Zellzahl (oben), Contrast und xPairColMax (mittig) sowie Corellation mit norm.Zellzahl (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse182

Abbildung 130: Punktwolken-Diagramm von IDM und MedianNND (oben), IDM mit MittelwertNND (mittig) sowie IDM und SDofCE (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse.....	183
Abbildung 131: Punktwolken-Diagramm von IDM mit xPairColMax (oben), IDM und CEwEdges (mittig) sowie Entropie mit MedianNND (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse.....	184
Abbildung 132: Punktwolken-Diagramm von Entropie und MittelwertNND (oben), Entropie mit SDofCE (mittig) sowie Entropie und abs.Zellzahl (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse.	185
Abbildung 133: Punktwolken-Diagramm von Entropie mit norm.Zellzahl (oben) sowie Entropie und CEwEdges (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse.	186
Abbildung 134: Gegenüberstellung der einzelnen Verfahren zur Diagnose der Früharthrose.....	201

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete Proben.....	42
Tabelle 2:	Verwendete Geräte	43
Tabelle 3:	Verwendetes Verbrauchsmaterial	43
Tabelle 4:	Verwendete Chemikalien und Reagenzien	44
Tabelle 5:	Verwendete Software	44
Tabelle 6:	Bezeichnung der Proben und jeweils gewählte makroskopisch-visuelle Einteilung des Knorpelschadens	67
Tabelle 7:	Zuordnung eines Wertes (Score) zu einem bestimmten Räumlichen Verteilungsmuster	69
Tabelle 8:	Proben-basierte (globale) Korrelationsanalyse der untersuchten einzelnen optisch-visuellen Klassifikationen.....	96
Tabelle 9:	Kachel-basierte (lokale) Korrelationsanalyse der untersuchten einzelnen optisch-visuellen Klassifikationen.....	97
Tabelle 10:	Proben-basierte (globale) Korrelationsanalyse der untersuchten Grauwert-Texturanalyse-Parameter.....	108
Tabelle 11:	Kachel-basierte (lokale) Korrelationsanalyse der untersuchten Grauwert-Texturanalyse-Parameter.....	109
Tabelle 12:	Darstellung der Anzahl der signifikanten Unterschiede in den quantitativen Parametern der räumlichen Organisation zwischen Graden der REM-visuellem Einteilung.	139
Tabelle 13:	Proben-basierte (globale) Korrelationsanalyse der untersuchten Fluoreszenzmikroskopisch erhobenen quantitativen Parameter der räumlichen Organisation.	140
Tabelle 14:	Kachel-basierte (lokale) Korrelationsanalyse der untersuchten Fluoreszenz-mikroskopisch erhobenen quantitativen Parameter der räumlichen Organisation.	141
Tabelle 15:	Proben-basierte (globale) Korrelationsanalyse zwischen den Parametern der Grauwert-Texturanalyse der REM-Bilder und den optisch-visuell erhobenen.....	155

Tabelle 16:	Kachel-basierte (lokale) Korrelationsanalyse zwischen den Parametern der Grauwert-Texturanalyse der REM-Bilder und den optisch-visuell erhobenen Scores.....	155
Tabelle 17:	Proben-basierte (globale) Korrelationsanalyse zwischen den quantitativen Parametern der räumlichen Organisation aus der Fluoreszenzmikroskopischen Analyse und den optisch-visuell erhobenen Scores.....	163
Tabelle 18:	Kachel-basierte (lokale) Korrelationsanalyse zwischen den quantitativen Parametern der räumlichen Organisation aus der Fluoreszenzmikroskopischen Analyse und den optisch-visuell erhobenen Scores.....	164
Tabelle 19:	Proben-basierte (globale) Korrelationsanalyse zwischen den Parametern der Texturanalyse der REM-Bilder und den quantitativen Parametern der räumlichen Organisation aus der Fluoreszenzmikroskopischen Analyse	178
Tabelle 20:	Kachel-basierte (lokale) Korrelationsanalyse zwischen den Parametern der Texturanalyse der REM-Bilder und den quantitativen Parametern der räumlichen Organisation aus der Fluoreszenzmikroskopischen Analyse und den optisch-visuell erhobenen Scores.....	179
Tabelle 21:	Auswahl eines Panels an quantitativen und qualitativen Parametern zur Analyse der räumlichen Organisation für die Anwendung im Testsystem für früh-osteoarthritische Veränderungen.....	187
Tabelle 22:	Summenbild der Signifikanztabellen von MWNND, SDofCE, Abs.Zellzahl, CEwEdges („Quantitativ“) und Pattern in Abhängigkeit der globalen REM-Klassifikation Grad 1 vs. Grad 2.....	188
Tabelle 23:	Gegenüberstellung farbkodierter Einteilungen des strukturellen Schadens und der visuellen Klassifikation der Organisationsanalyse und der Entropie mit den globalen REM-visuellen Einteilungen als Referenz.....	189
Tabelle 24:	Erweiterte Gegenüberstellung farbkodierter Einteilungen des strukturellen Schadens, der quantitativen und qualitativen Parameter (visuelle Klassifikation) der Organisationsanalyse und der Entropie mit der globalen REM-visuellen Einteilung als Referenz.....	190
Tabelle 25:	Farbkodierte Qualitative und quantitative Daten der Organisationsanalyse aller Kacheln, die als REM-lokal Grad 1 (intakte Oberfläche) eingeteilt wurden.	192 und 193

IV Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AbsZZ	Absolute Zellzahl
(M)ACT	(Matrix-induzierte) Autologe Chondrozyten Transplantation
ASK	Arthroskopie
ASM	Angular Second Moment
CEI	Clark-Evans-Index
Con	Contrast
Cor	Correlation
CT	Computertomographie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMOAD	Disease modifying Osteoarthritis Drugs
ECM	Extra cellular matrix
EIIMi	Raster-Elektronenmikroskopie
Ent	Entropy
IDM	Inverse Difference Moment
IGF	Insulin-like growth factors
ICRS	International Cartilage Research Society
IL-1	Interleukin – 1
K-TEP	Kniegelenks-Totalendoprothese
MedNND	Median Nearest Neighbor Distance
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MRT	Magnetresonanztomographie
MwNND	Mittelwert Nearest Neighbor Distance
NND	Nearest Neighbor Distance
NormZZ	Normierte Zellzahl
OA	Osteoarthrose
OARSI	Osteoarthritis Research Society International
OATS	Osteochondrale, autologe Transplantation
PCF	Pair Correlation Function
PCF-Xmax	Pair Correlation Function X-Maximum

PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Platelet derived growth factor
ppi	point per inch
REM	Rasterelektronenmikroskopie
SDofCE	Standard Deviance of Clark-Evans-Index
SYSADOA	Symptomatic slow acting drugs in Osteoarthritis
Tab.	Tabelle
TGF- β	Tumor growth factor- β
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor – α
vs.	versus

1. Einleitung

1.1 Osteoarthrose

Die Osteoarthrose (Syn. Arthrose, OA) ist unter anderem gekennzeichnet durch den Untergang des hyalinen Gelenkknorpels. Sie ist eine weltweit häufig vorkommende Erkrankung und die häufigste Gelenkerkrankung mit deutlicher Altersabhängigkeit und steigender Prävalenz im Zuge des demografischen Wandels [1].

Die empfundenen subjektiven Beschwerden der Betroffenen können dabei immense Ausmaße annehmen und weitreichende Folgen wie Verlust der Teilhabe bzw. sozialen Rückzug zur Folge haben. Daneben besteht eine hohe sozioökonomische Relevanz. Allein in Deutschland gehen die Behandlungskosten in den fortgeschrittenen Milliarden-Bereich, die Anzahl der durch Arthrose verursachten Fehltage am Arbeitsplatz ist kaum zählbar [2].

Die Möglichkeiten der Diagnostik der Arthrose sind altbekannt. Hier sind neben Anamnese und klinischer Untersuchung auch apparative Verfahren wie konventionelle Röntgendiagnostik und darüber hinaus auch Schnittbildverfahren wie Computertomographie und Magnetresonanztomographie zu nennen. Die Sonographie spielt im Allgemeinen bei der Arthrose-Diagnostik keine wesentliche Rolle [3].

Gemeinsamkeit der genannten bildgebenden Verfahren ist die Tatsache, dass sie lediglich bei bereits relativ deutlichen Veränderungen des Gelenks entsprechende Nachweise über das Schadenausmaß zu erbringen vermögen. Röntgen und Computertomographie können hierbei teilweise nur indirekte Informationen zu den beteiligten Strukturen zu erbringen, da der Gelenkknorpel selbst nicht dargestellt wird. Die Magnetresonanztomographie ist mittlerweile ein Standarddiagnostikum in der Darstellung des Gelenkknorpels und flächendeckend verfügbar. Bereits die Standard-Wichtungen lassen in Abhängigkeit der Leistungsfähigkeit des Gerätes Aufschluss über den Zustand des Knorpels ab einem gewissen Schädigungsgrad auch in Hinblick auf die genaue Lokalisation zu. Einige MRT-Protokolle (MOCART-Bewertungssystem, dGEMRIC, T2/T1rho-Mapping) vermögen den Gelenkknorpel noch genauer zu analysieren, sind aber sehr aufwendig und daher (noch) nicht für Routine-Untersuchungen einsetzbar. [4]

Die Entwicklung von weiteren diagnostischen Verfahren, insbesondere zur Detektion von arthrotischen Veränderungen in frühen Stadien, ist aktuell Gegenstand der Forschung. Neben Weiterentwicklungen der MRT-Diagnostik werden unter anderem Verfahren wie Optische Kohärenztomografie (OCT), Ultraschall-Indentation, Diffraction-Enhanced Synchrotron-X-Ray-Imaging-(DEI) (Untersuchungen mit einem Teilchenbeschleuniger), Ultraschalluntersuchungen ex vivo und Spektrometrische Techniken untersucht und entwickelt [5]. Die meisten dieser Verfahren werden dabei hinsichtlich der Erkennungsgenauigkeit des Schweregrades von Knorpelschäden im

Vergleich zu standardisierten histologischen Klassifikationen nach Mankin [6] bzw. OARSI [7] als Referenz untersucht.

Die therapeutischen Möglichkeiten sind vielfältig, aber lediglich als symptomatisch zu bezeichnen. Hierzu gehören Krankengymnastik und Physikalische Maßnahmen, topische und systemische Antiphlogese und Analgesie, Akupunkturbehandlung, Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln, Versorgung mit orthopädischen Hilfsmitteln und Orthesen und auch intraartikuläre Injektionen. In den letzten Jahren galt es Fortschritte im Bereich der Transplantation körpereigener Knorpelzellen mit guten Erfolgen zu verzeichnen (MACT, OATS), bei kleineren Läsionen kann die antegrade Anbohrung des subchondralen Knochens (Mikrofrakturierung) zur Anregung der Ausbildung eines regenerativen Faserknorpels helfen. Bei Fehlstellungen besteht die Möglichkeit achskorrigierender Eingriffe, um die biomechanischen Voraussetzungen zu optimieren und die auf das Gelenk einwirkenden Kräfte besser zu verteilen. An letzter Stelle der therapeutischen Kaskade besteht die Möglichkeit zum teilweisen oder vollständigen Gelenkersatz mit allen weiteren Konsequenzen im Sinne notwendiger Rehabilitationen und aufwendiger Wechseloperationen [4,8,9].

Grundlegendes Problem in der Behandlung der Arthrose ist die Tatsache, dass einmal untergegangener bzw. sichtbar geschädigter hyaliner Gelenkknorpel unwiederbringlich eigentlich verloren ist [10]. Seine Möglichkeiten zur Selbst-Regeneration sind begrenzt. Wie beschrieben zeigen die breit zur Verfügung stehenden diagnostischen Möglichkeiten Schäden am Knorpel erst bei relativ deutlichen Veränderungen an (ab OARSI-Stadium 2-3 [6]). Allen Methoden ist gemeinsam, dass sie keine Möglichkeit zur Erkennung von Frühschäden bzw. der Arthrose im Initial-Stadium bieten.

In der vorliegenden Arbeit wird analysiert in wieweit Veränderungen im räumlichen Organisation der Chondrozyten der humanen Femurcondyle mit visuell erfassbaren Schäden – makroskopisch und elektronenmikroskopisch – in Zusammenhang stehen. Es kann aufgezeigt werden, dass erste lokale räumliche Veränderungen in der Verteilung der Chondrozyten bereits auftreten, obwohl sich selbst elektronenmikroskopisch noch eine völlig unauffällige, glatte Oberfläche darstellt. Dabei lassen sich von lokalen Veränderungen keine Rückschlüsse auf den Zustand des Knorpels im Gelenk im Gesamten ziehen und umgekehrt.

Somit wäre eine in-vivo-Analyse der räumlichen Organisation der Knorpelzellen an der gelenkseitigen Oberfläche eventuell eine vielversprechende Möglichkeit zur „Früh-Diagnose“ einer sich entwickelnden Osteoarthrose. Entsprechende Verfahren, die sich der Zwei-, bzw. Multiphotonen-Mikroskopie (diese verursacht wesentlich weniger Streu-Fluoreszenz, als die herkömmliche Fluoreszenzmikroskopie) und des Fluorescence-Lifetime-Imaging bedienen, befinden sich aktuell in der experimentellen Entwicklung.

Bei im Frühstadium befindlichen Veränderungen des Knorpels könnte dann im Weiteren eine angepasste Therapie abgeleitet werden, da das Knorpelgewebe im Anfangsstadium von Schäden im Vergleich zum Spätstadium über erhöhtes Potential zur Regeneration zu verfügen scheint.

1.2 Anatomie

1.2.1 Anatomie des menschlichen Kniegelenks

Das Kniegelenk als Ganzes mit einer Gelenkhöhle besteht aus zwei Teilgelenken, in denen drei Knochen (Oberschenkel, Schienbein und Kniescheibe) miteinander artikulieren.

Das Oberschenkel-Kniescheibengelenk (*Articulatio femoropatellaris*) ist ein Schlittengelenk und beinhaltet die Knorpelbeläge auf der Rückseite der Kniescheibe (*Facies articularis patellae*) und der Vorderseite des distalen Oberschenkelknochens (*Facies patellaris femoris*). Bei Bewegung in diesem Gelenk gleitet die Kniescheibe formbedingt in einer Rinne. Mit zunehmender Beugung steigt der Druck, der auf die Gelenkpartner wirkt. Dieser beträgt schon ohne besondere Beanspruchung mehr als 100kg/cm^2 [11].

Dabei trägt die femorale Gelenkseite den mit bis zu 6mm Stärke dicksten Belag mit hyalinem Gelenkknorpel [12].

Den Hauptanteil des Kniegelenks bildet das Oberschenkel-Schienbein-Gelenk, auch Kniekehlgelenk genannt (*Articulatio femorotibialis*). Dieses ist ein Dreh-Scharniergelenk, oder auch bicondyläres Gelenk. Es ermöglicht zum einen die Beugung und Streckung im Kniegelenk (Roll-Gleit-Bewegung) sowie in 90° Beugestellung eine leichte Einwärts- und Auswärtsdrehung der Tibia gegenüber dem Femur (Rotations-Bewegung). Gelenkpartner bilden hierbei die jeweils korrespondierenden medialen und lateralen Femur- und Tibiacondylen (*Condyli femoris et tibiae*).

Die zapfenförmig in die *Fossa intercondylaris* des Oberschenkels hineinragende *Eminentia intercondylaris* der Tibia verleiht dem Kniegelenk knöcherne Stabilität. Diese wird im Weiteren aufgrund der großen Beweglichkeit des Kniegelenks hauptsächlich durch den komplizierten Kapsel- und Bandapparat gewährleistet. Neben vorderem und hinterem Kreuzband, die einer übermäßigen antero-posterioren Translation entgegenwirken, und dem medialen und lateralen Kollateralband, die ein varisches bzw. valgisches Aufklappen des Kniegelenks in Frontalebene verhindern bestehen weitere, zahlreiche dorsale (*Lig. popliteum obliquum*, *Lig. popliteum arcuatum*, *M. popliteus*, Ansatz- und Ursprungssehnen der kniegelenksübergreifenden Muskulatur, z.B. Sehnen der *Mm. Gastrocnemius lateralis* und *medialis*), ventrale (*Retinacula patellae*, *Lig. patellae*, *Tendo M. quadriceps femoris*) und auch seitliche (z.B. *Fascia lata*) Stabilisatoren.

Der relativ geringe Formschluss im Femorotibialgelenk wird vorwiegend durch den jeweils halbmondförmigen Innen- und Außenmeniskus kompensiert. Diese weisen eine Keilform auf, wobei die untere Seite plan auf den Tibiacondylen aufliegt, während sich die Oberseite konkav gewölbt den Femurcondylen anschmiegt. Die Menisken

bestehen in ihrem Kern aus Faserknorpel mit zirkulärer Ausrichtung der Faserbündel, was die Umwandlung von Druck- in Zugkräfte ermöglicht. Der äußere Teil der Menisken besteht aus straffem Bindegewebe. An ihrer Außenseite sind die Menisken mit der Gelenkkapsel, im Falle des Innenmeniskus auch mit dem medialen Kollateralband, verwachsen. Der Knorpelüberzug der femorotibialen Gelenkflächen besteht aus hyalinem Gelenkknorpel [13].

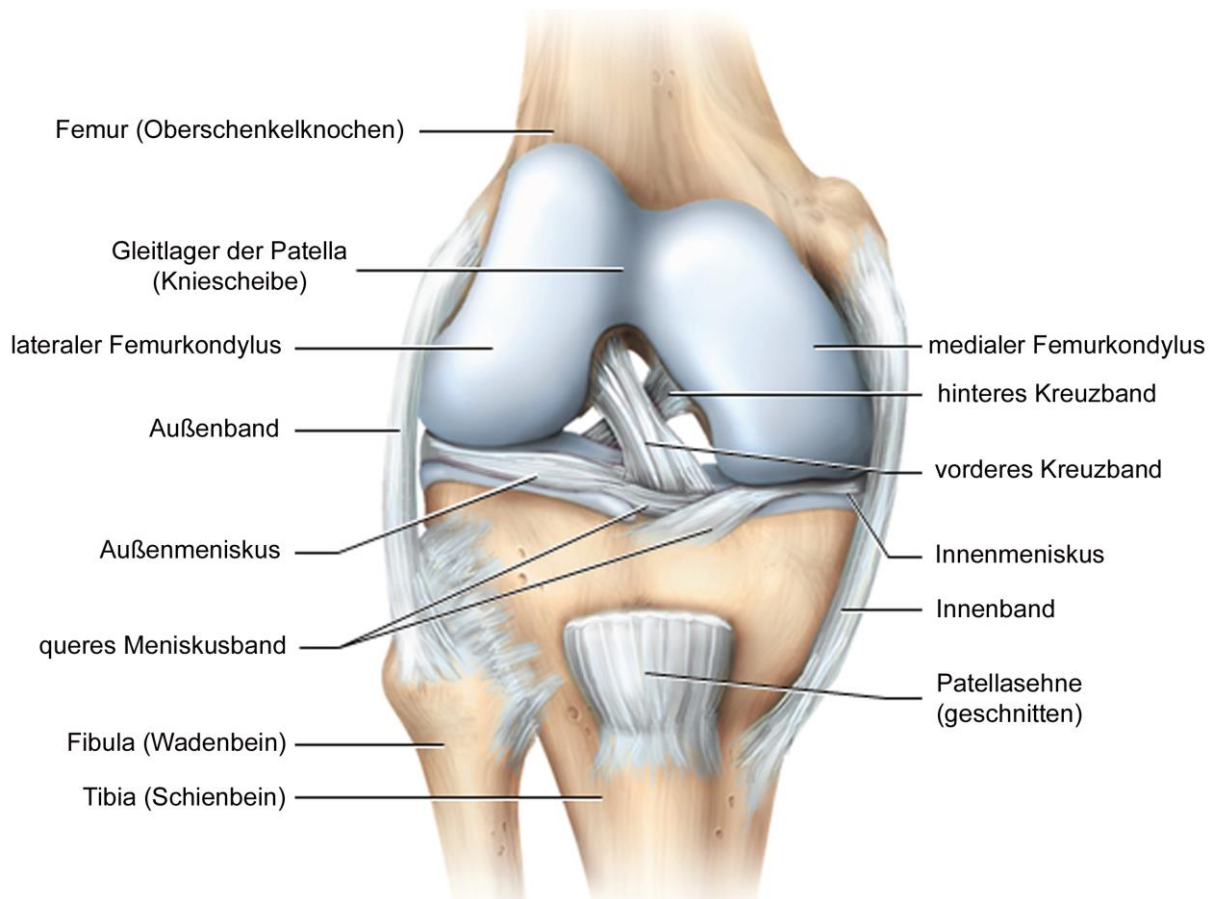


Abb. 1: *Rechtes Kniegelenk mit Bändern und Menisken von vorne. Schematische Darstellung [14]*

1.2.2 Der hyaline Gelenkknorpel

Alle Knorpelgewebe des Menschen gehen aus dem Mesenchym hervor. Es werden drei verschiedene Arten unterschieden: Hyaliner Gelenkknorpel, Elastischer Knorpel und Faserknorpel.

Hyaliner Gelenkknorpel kommt beim Menschen vor als Rippenknorpel, Gelenkknorpel, Nasenknorpel, als Knorpelspangen in der Trachea sowie als Knorpelstückchen in den Bronchen.

Elastischer Knorpel existiert im Kehlkopfskelett, der Tuba auditiva, an der Ohrmuschel und dem äußeren Gehörgang.

Faserknorpel ist zu finden in den Bandscheiben der Wirbelsäule, den Gelenkzwischen-scheiben (z.B. Meniskus, Symphyse, Schulterreckgelenk).

Im Weiteren soll auf den in dieser Arbeit untersuchten hyalinen Gelenkknorpel eingegangen werden.

Als spezialisierter Gewebetyp bildet hyaliner Gelenkknorpel die artikulierenden Gelenkkörper nahezu aller Knochen und Gelenke sowie im Wachstum die Epiphysenfugen. Im Gesunden ist er äußerst glatt und ermöglicht eine fast reibungslose Beweglichkeit der Gelenkpartner.

Er besteht aus Chondrozyten und Interzellulärsubstanzen (auch Extrazelluläre Matrix genannt).

In seiner Entwicklung bilden aus dem Mesenchym stammende Chondroblasten eine proteoglykan-haltige, extrazelluläre Matrix und geben diese, vom Transkriptionsfaktor Sox 9 kontrolliert, nach allen Seiten ab. Auf diese Weise werden die Chondroblasten zu Chondrozyten, die sich fortan teilen und so kleine Zellgruppen bilden können. Sich um einzelne Zellen oder Zellgruppen verdichtende, basophile extrazelluläre Matrix bildet dabei einen Knorpelhof (Territorium), der zusammen mit den zugehörigen Knorpelzellen die Einheit eines Chondrons bildet.

Bei der Interzellulärsubstanz handelt es sich überwiegend um Kollagene und Proteoglykane.

Knorpelspezifisch handelt es sich dabei um Kollagen Typ II, welches durch die Typen VI, IX und XI ergänzt wird. Diese Kollagene bilden feine, polarisations- und elektronenmikroskopisch nachweisbare Fibrillennetze. Entsprechend ihrer funktionellen Beanspruchung richten sich die Kollagenfibrillen am hyalinen Gelenkknorpel der langen Röhrenknochen, so auch am distalen Femur, trajektionell in Arkadenform aus. Dabei bilden Sie unter der Knorpeloberfläche eine tangentielle Schicht.

Entlang der Kollagen-Arkaden besteht eine spezifische räumliche Organisation der Chondrozyten. Diese lässt sich mikroskopisch in 4 Zonen einteilen: eine superfizielle, eine transitionelle, eine radiäre und eine kalzifizierte Zone.

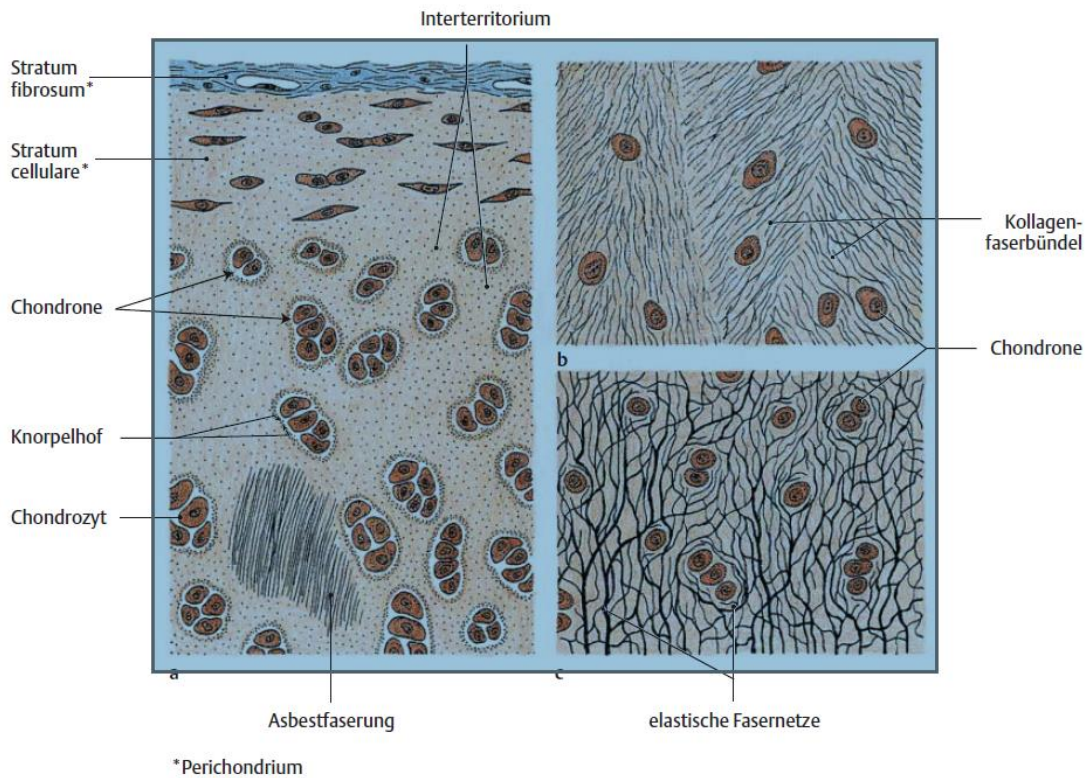


Abb. 2: *Histolog. Schema der drei Knorpelarten: a) Hyaliner Knorpel, b) Faserknorpel, c) Elastischer Knorpel* [15]

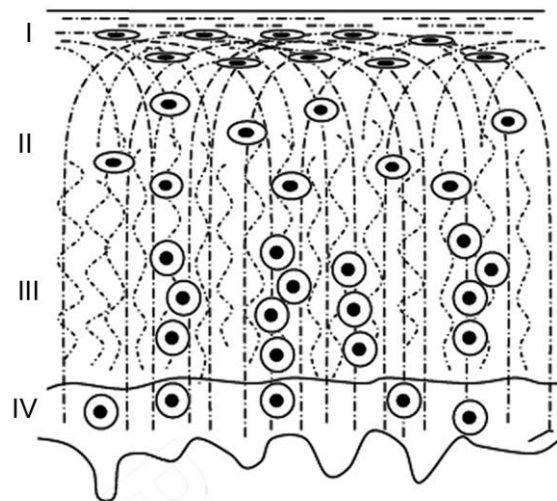


Abb. 3: *Schema der zonalen Zellausrichtung entlang der Kollagen-Arkaden im Hyalinen Knorpel: Die Knorpelzellen richten sich nach dem Verlauf der Kollagen-Fasern aus. I: Superfizielle Zone mit horizontaler Ausrichtung der Knorpelzellen. II: Transitionelle Zone mit eher zufälliger Ausrichtung. III-IV: Radiäre und Kalzifizierte Zone mit vertikaler Ausrichtung der Knorpelzellen (verändert nach [16]).*

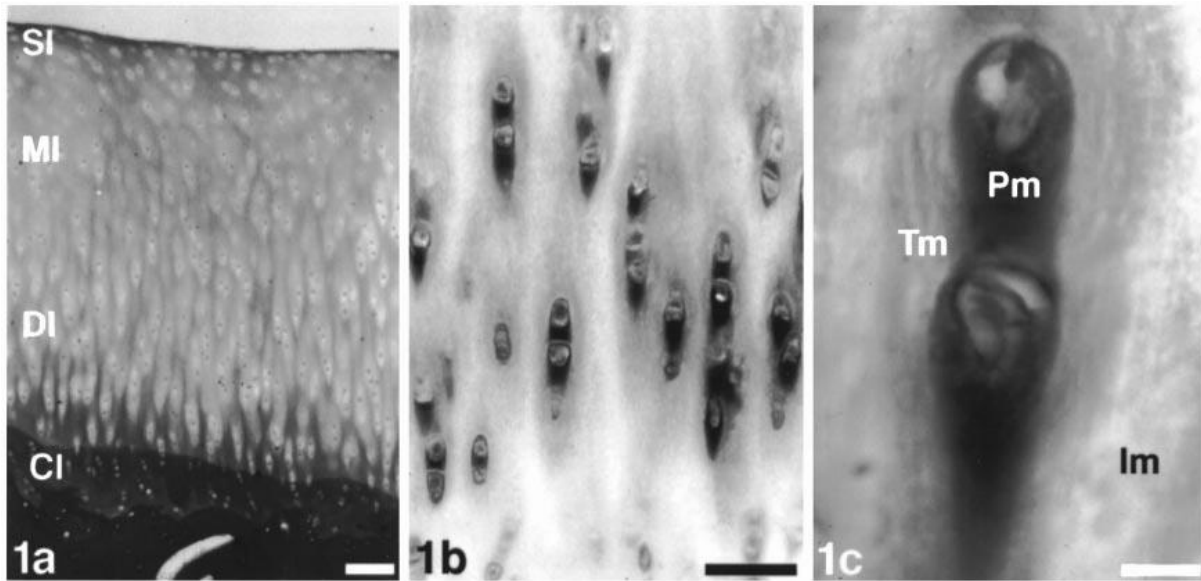


Abb. 4: Hyaliner Knorpel, Histologische Schnitte. 1a: Kollagenfärbung; Einteilung der Zonen in die Superfizielle Zone (SI), die transitionelle Zone (MI), die radiäre Zone (DI) und die kalzifizierte Zone (CI). 1b: Radiäre Ausrichtung und Organisation der Matrix in den tieferen Zonen. 1c: Detailansicht zur Unterscheidung verschiedener Bereiche der ECM. Die Perizelluläre Matrix (Pm) ist durch die perizelluläre Kapsel von der Territorialmatrix (Tm) getrennt. Als Interterritorialmatrix (Im) wird der Bereich zwischen den Chondronen bezeichnet. Skala: 1a: 100 μm 1b: 50 μm 1c: 10 μm [17]

Diese Einteilung lässt sich ableiten aus Unterschieden hinsichtlich der Zellanordnung, der Anordnung der Kollagenfasern, des Wassergehaltes, der Morphologie und der Glykosaminoglykankonzentration [18].

In der oberflächlichen Zone (Zone I) zeigen sich die Chondrozyten horizontal ausgerichtet, in tieferen Zonen eher kolumnal angeordnet. Von Zone I bis IV nimmt die Zelldichte kontinuierlich ab, dagegen steigen Zellvolumen und Verhältnis vom Proteoglykan- zum Kollagengehalt [19].

Proteoglykane sind relativ große Moleküle und bestehen aus einem eine „Core“-Protein, einem langen, filiformen Kern. Im hyalinen Knorpel ist dies vorwiegend Aggrecan (besteht zu 90% aus Chondroitinsulfat) und Keratan.

Das Coreprotein ist einerseits mit Hyaluronsäuresträngen (einem Glykosaminoglykan), andererseits mit den Kollagenfibrillen verbunden. Die Knorpelhöfe enthalten viel Aggrecan, nur wenig Kollagen und dafür additiv Chondronektin, einem Glykoprotein, welches die Knorpelzellen am Kollagen der Grundsubstanz festhält [20].

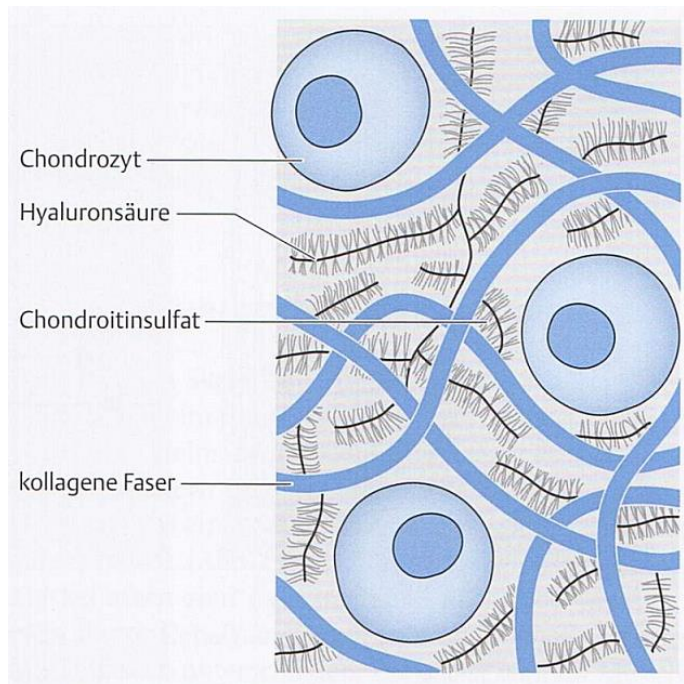


Abb. 5: Aufbau der Matrix des Hyalinen Knorpelgewebes [21]

Hyaliner Gelenkknorpel ist im Vergleich mit Knochen nur wenig druck- und zugfest. [22]. Er besteht aus ca. 65-80% aus Wasser, die Chondrozyten selbst nehmen rund 1-5% des Volumens ein [23,24].

Eine neben den reibungsarmen Gleiteigenschaften der Oberfläche weitere Aufgabe und Besonderheit des Hyalinen Knorpels ist es, lokale Druckbelastungen breit auf den subchondralen Knochen zu verteilen. Hierfür ist zwischen dem feinen, engen Proteoglykan-Hyaluronsäure-Kollagen-Netzwerk Wasser so eingelagert, dass sich die Wassermoleküle mit ihren negativ geladenen Polen gegenüberstehen und sich gegenseitig abstoßen. Die Kombination aus Wasser-induziertem Quellungsdruck und Zugfestigkeit der kollagenen Fasern erlaubt einen hydrostatischen Kraftfluss: Das Wasser fließt unter mechanischem Druck entweder in die Synovialflüssigkeit oder in Bereiche der extrazellulären Matrix, die weniger unter Kompression stehen. Der Knorpel nimmt in diesem belasteten Bereich entsprechend an Dicke ab. Dies geschieht solange bis hydrostatischer Druck und von außen einwirkende Kraft im Gleichgewicht stehen. Nach Abnahme des von außen wirkenden Druckes fließt das Wasser aufgrund des osmotischen Gradienten und der negativen Polarität der Glykosaminoglykane wieder in die nun druckentlasteten Bereiche zurück, die Deformierung des Knorpels bildet sich zurück [25].

Der hyaline Knorpel besitzt keine eigenen Blutgefäße und (im Gegensatz zum elastischen und Faserknorpel) kein Perichondrium, weshalb die Ernährung durch Diffusion von der synovialen Flüssigkeit erfolgt. Die Ernährung wird durch den oben dargestellten regelmäßigen Wechsel von Belastung und Entlastung unterstützt. Die

extrazelluläre Matrix erfährt hierbei einen relativ hohen Turn-over. Hyaliner Gelenkknorpel ist weiterhin frei von Nerven oder lymphatischem Gewebe [12,26,27].

1.2.2.1 Die räumliche Organisation der superfiziellen Chondrozyten des hyalinen Gelenkknorpels

Die superfizielle Zone des Hyalinen Gelenkknorpels ist die zellreichste, mit 200-300µm Dicke aber auch die dünnste aller vier Zonen. Auf (bio)mechanische Stimuli lassen sich proliferative und biosynthetische Reaktionen nachweisen. Die Chondrozyten dieser Zone weisen neben der höchsten zellulären Dichte aller vier Zonen eine flache, ellipsoide Struktur und oberflächenparallele Ausrichtung auf [25,28].

Der Kollagengehalt dieser Zone ist ebenfalls am höchsten. Auch die Kollagenfasern liegen ganz oberflächennah parallel zur Oberfläche ausgerichtet vor. Zug- und Druckkräfte können so am besten aufgenommen und absorbiert bzw. umverteilt werden [29,30]. Mehrere Arbeiten zeigen, dass sich die Chondrozyten in den jeweiligen Schichten hinsichtlich Stoffwechsel, Genexpression und Zytoskelett unterscheiden [25,31,32].

Bedeutsam hierbei ist unter anderem, dass die Knorpelzellen der obersten Schicht spezifische, horizontale Verteilungsmuster wie Zellreihen, Zellhaufen, Paare und einzelne Zellen (Strings, Cluster, Pairs, Singles) ausbilden [33].

Die Art des Organisationsmusters der superfiziellen Knorpelzellen ist dabei vom jeweiligen biomechanischen Gelenktyp abhängig. So überwiegt in jedem Gelenktyp eines der vier genannten Grundmuster. Dies lässt darauf schließen, dass die oberflächliche Zone auf die Anforderungen und Belastungen eines jeden Gelenktyps abgestimmt und spezialisiert ist. (Zum Beispiel im Kniegelenk, im oberen Sprunggelenk und im Schultergelenk). An den Kondylen des Kniegelenks dominiert dabei der String-Typ [25].

Als oberste Schicht des Gelenkknorpels ist die superfizielle Zone direkt den größten mechanischen Kräften ausgesetzt und damit am anfälligsten für degenerative bzw. entzündlich-bedingte Erkrankungen und direkte Verletzungen.

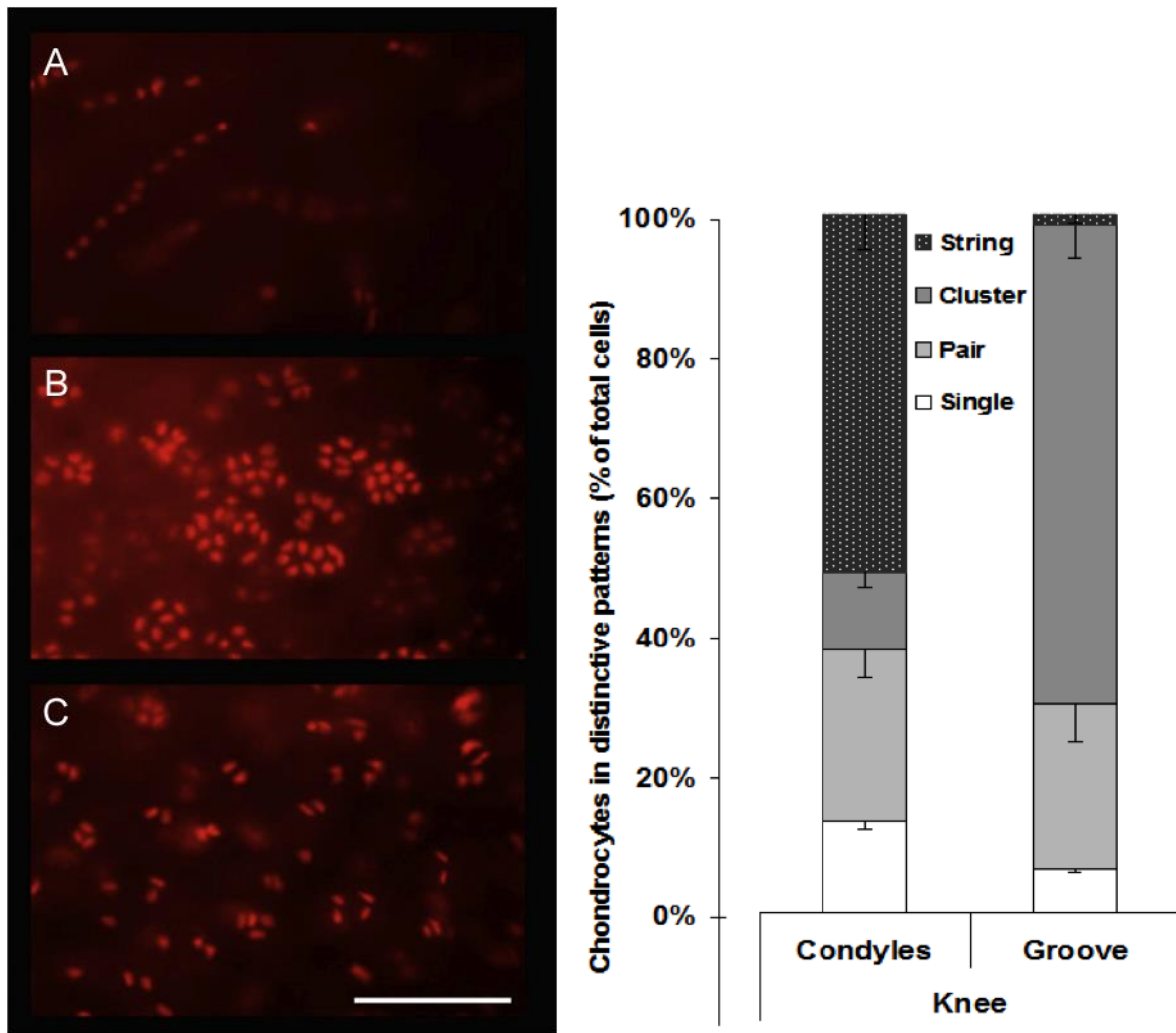


Abb. 6: *Verschiedene Zell-Muster der Chondrozyten in der superfiziellen Zone.* Links: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Organisation von superfiziellen Chondrozyten in der Condyle eines intakten humanen Kniegelenkes. Propidiumiodidfärbung. Es sind verschiedene Zellmuster zu sehen: A: Strings, B: kleine Cluster, C: Paare. Einzelne Zellen sind in jeder Aufnahme verstreut. Skala: 100 μ m. Rechts: Die prozentualen Anteile der Chondrozyten in diesen Mustern ist mit der unterschiedlichen Gelenkbiomechanik assoziiert. Vergleich zwischen Femurcondyle und Fossa intercondylaris (groove) [entnommen aus 33].

1.3 Veränderungen des hyalinen Gelenknorpels bei Osteoarthrose

Als Osteoarthrose – oder synonym Arthrose – bezeichnet man einen pathologischen Prozess in den Gelenken. Dieser Prozess kann unterschiedliche Ursachen haben, mündet jedoch in immer dem gleichen biologischen und morphologischen – und oftmals auch klinischen – Verlauf.

Bei der Arthrose werden primäre von sekundären unterschieden. Primäre oder auch idiopathische Arthrosen zeichnen sich durch das Fehlen von Risikofaktoren aus. Bestehen jedoch z.B. nachweisbare mechanische Formstörungen der Gelenkpartner (z.B. anlagebedingt wie bei Hüftdysplasie oder auch posttraumatisch) oder lokale oder systemische Erkrankungen (z.B. bei metabolische oder endokrine Störungen wie bei Ochronose, Hämophilie, Hämochromatose, Diabetes mellitus, Hyperurikämie, septischen Arthritiden, Durchblutungsstörungen (z.B. M. Ahlbäck, Osteochondrosis dissecans) oder Erkrankungen aus dem Rheumatischen Formenkreis) spricht man von sekundären Arthrosen [34,35,36].

Dabei können Arthrosen lokalisiert oder generalisiert (mindestens in drei Gelenkregionen des Körpers betroffen) bestehen.

Die Osteoarthrose definiert sich durch die Beteiligung des gesamten Gelenkes einschließlich Gelenkschleimhaut, Synovialflüssigkeit, Knorpel, intraartikulären Discus/Meniscen, Bändern, der Kapsel und des subchondralen Knochens [37].

Unbehandelt für sie zu Schmerzen, Bewegungseinschränkungen und Gelenkeinstellungen, Fehlstellungen und zum fortführenden Verlust der Gelenkfunktion. Hierbei besteht eine hohe sozioökonomische Relevanz. Weltweit sind nach aktuellen Schätzungen ca. 18% der Frauen und 9,6% der Männer ≥ 60 Jahre von Osteoarthrose betroffen. In Deutschland wurde 2010 die Lebenszeitprävalenz für die Entwicklung einer Osteoarthrose bei Frauen auf ca. 25% und bei Männern auf ca. 16,5% geschätzt. Dies mit steigender Tendenz aufgrund der demographischen Entwicklung [38,39,40].

Laut der Gesundheitsberichterstattung des Bundes entstanden nur durch die Diagnose „Kniegelenksarthrose“ (ICD-10 Diagnose M17) in Deutschland im Jahr 2011 allein bei gesetzlich krankenversicherten Patienten ohne Rentner bei knapp 115.000 Fällen insgesamt 4.971 Millionen Tage der Arbeitsunfähigkeit (43,2 Tage pro Fall) [41]. Die Krankheitskosten für Arthrose (ICD-10 Diagnosen M15 bis M19) betragen dabei in Deutschland laut Statistischem Bundesamt im Jahr 2008 rund 7,62 Milliarden Euro [42]. Nicht abschätzbar hieraus sind weitere Folgen der Arthrose wie z.B. Sozialer Rückzug oder die Entwicklung von krankheitsbedingten Depressionen.

Risikofaktoren für die Entstehung einer Arthrose sind weiterhin neben dem Alter und dem weiblichen Geschlecht auch Übergewicht und Überbelastungen z.B. durch schwere körperliche Arbeit oder Fehlbelastungen. Eine Schwäche der das jeweilige

Gelenk übergreifenden Muskulatur kann eine Arthrose mitauslösen und ist nicht nur Folge einer Arthrose. Moderate sportliche Betätigung führt dagegen nicht zur Ausbildung einer Arthrose [34].

Nach aktueller Kenntnis zeigen sich in einem relativ frühen Stadium der Arthrose erste sichtbare Veränderungen der Knorpeloberfläche in Form von kleinen Aufrauungen (Fibrillationen) oder Fissuren. Bei fortschreitender Abnahme des Proteoglykangehaltes verliert der Knorpel zunehmend seine Elastizität, so dass tiefe Risse entstehen können. Hieraus erfolgt die weitergehende Zerstörung des Knorpels bis hin zum kompletten Verlust des Knorpelüberzugs und zur Freilegung des subchondralen Knochens.

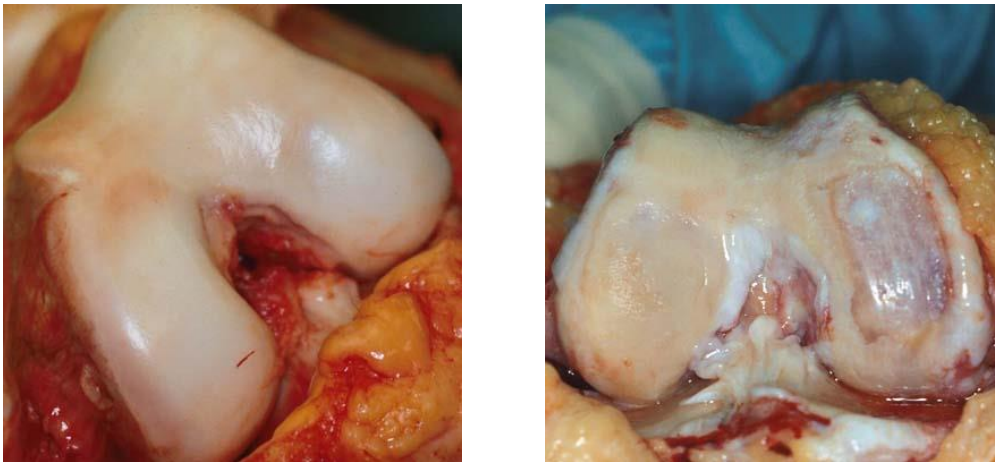


Abb. 7: Ansicht des Knorpels einer gesunden Femurcondyle (links) und sichtbare Veränderungen des Knorpelüberzugs bei Arthrose (rechts) [44]

Biochemisch bestehen im gesunden Knorpel anabole und katabole Stoffwechselprozesse nebeneinander. Diese werden u.a. durch Zytokine, Wachstumsfaktoren und Matrixmetalloproteinasen (MMPs) gesteuert. Aus kataboler Sicht kommen hierbei IL-1 und TNF- α eine zentrale Rolle zu, da sie die Synthese von Kollagenen und Proteoglykanen vermindern und zudem noch die Synthese von proteolytischen Enzymen stimulieren können (MMPs). Anabol wirkende Wachstumsfaktoren wie TGF- β , PDGF und IGF zeigen altersabhängig eine Verminderung ihrer Konzentration im Knorpel. Sie wirken antagonistisch auf Entzündungsmediatoren und stimulieren direkt den Zellmetabolismus. Bei der Arthrose kommt es zu einem zunehmenden Ungleichgewicht der beiden Prozesse. Kollagen II wird zunächst an der Knorpeloberfläche, später auch in tieferen Schichten abgebaut. Es folgt eine gesteigerte Biosyntheserate der Chondrozyten, wobei im Versuch die geschädigte ECM zu reparieren, eher knorpeluntypische Matrixkomponenten wie Prokollagen IIa, Kollagen I, III, VI und auch Proteoglykan gebildet werden. Letzteres führt über die vermehrte Bindung von Wasser zu einer Auflockerung der Struktur und damit zu einer verminderten Stabilität mit erhöhter Anfälligkeit für mechanisch induzierten Abrieb. Im nächsten Schritt überwiegen die katabolen Stoffwechselprodukte, die die Matrixsynthese hemmen und aufgrund ihrer

proteolytischen Eigenschaften zum inneren Abbau der ECM beitragen [6,27,45,46]. Ebenfalls konnten phänotypische Unterschiede in der Expression von Genen, die an Zellproliferation und ECM-Synthese beteiligt sind, im Bereich einer Knorpelläsion wie auch im benachbarten intakten Gewebe nachgewiesen werden [47].

Hierbei verändern sich auch Zahl und Anordnung (räumliche Organisation) der Chondrozyten selbst - und dies sowohl im Bereich der Läsion als auch im umgebenden, eigentlich intakten Knorpelgewebe [48,49]. Darüber hinaus bestehen deutliche Unterschiede in der räumlichen Organisation von Chondrozyten innerhalb und außerhalb einer Knorpelläsion [50]. Dabei weisen in gesunden Arealen die Chondrozyten die oben beschriebene räumliche Organisation in Paaren, Strings, Doublestrings und kleinen Clustern auf. Diese räumliche Organisation geht in den Gebieten einer bestehenden oder voranschreitenden Arthrose verloren [51]. Es bilden sich mit zunehmender Zerstörung des Knorpels immer größere Cluster aus. Nachfolgend geht die strukturierte räumliche Anordnung der Chondrozyten verloren, ein diffuses Verteilungsmuster entsteht. Zum Schluss entstehen immer größere zellfreie Areale (Apoptose-Areale). Eine 3D-Rekonstruktion der typischen Veränderungen der Chondrozytenorganisation von einem gesunden zu osteoarthritischen Zuständen ist in Abb. 8 gegeben.

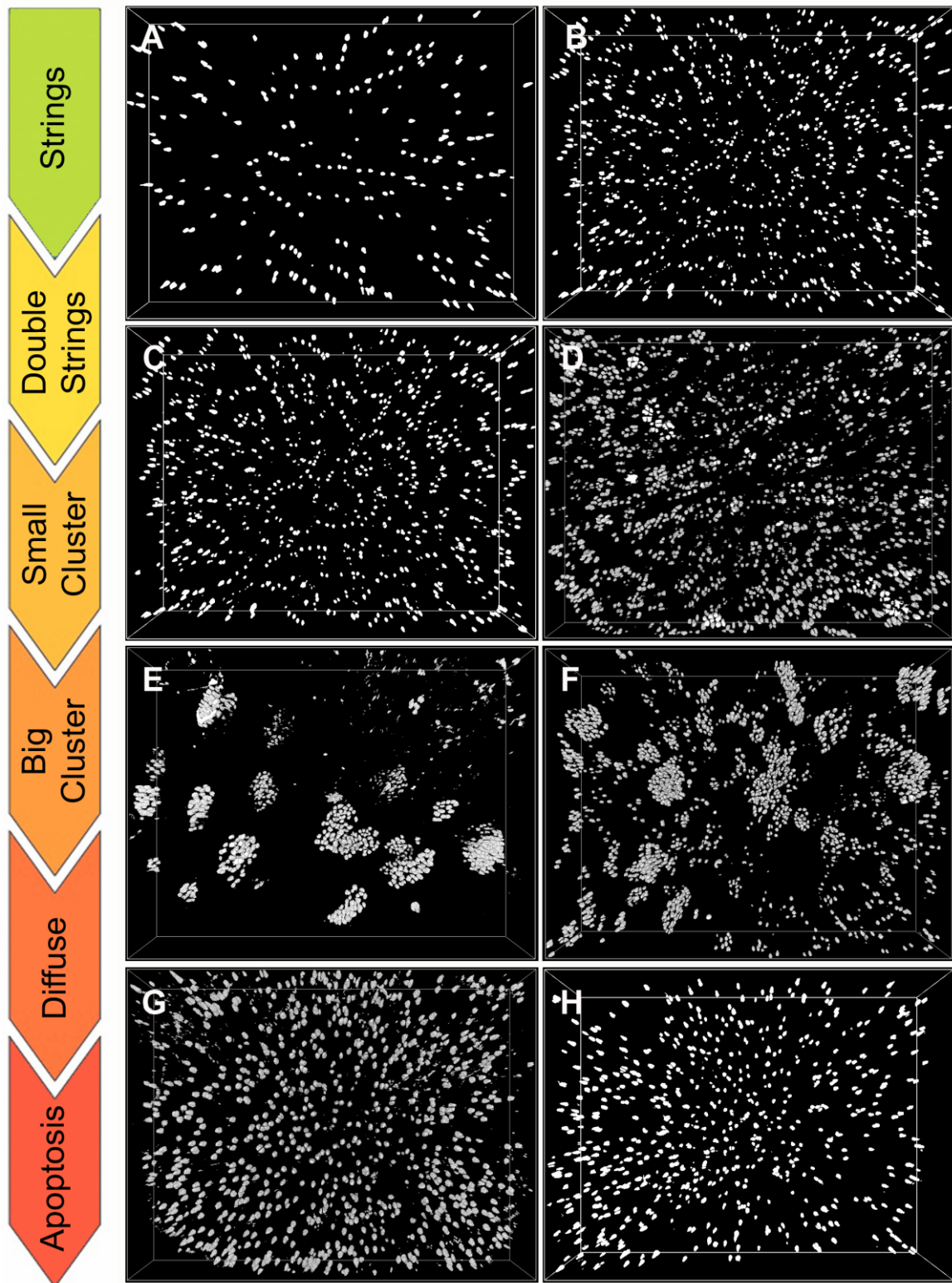


Abb. 8: 3D-Rekonstruktion der Veränderung der Chondrozytenorganisation Sekundärsignale der Chondrozytenzellkerne; Punktmuster im dreidimensionalen Raum. Fließender Übergang der verschiedenen Stadien: Strings (A,B), Doublestrings (B,C,D), kleine Cluster (D,E), große Cluster (F), Diffuse (G) und Apoptose (H) [52].

1.4 Aktuelle Diagnostik und Therapie von Knorpelschäden des Knies

Die aktuell zur Verfügung stehende Diagnostik zur Erfassung von Knorpelschäden des Knies bei Konsultation des Arztes erfolgt neben der Anamnese und der klinischen Untersuchung über bildgebende Verfahren:

Röntgen

Das konventionelle Röntgenbild des Knies ist das bildgebende Standard-Diagnostikum. Bei guter Darstellung des Knochens kann es allerdings die weichteiligen Kniebinnenstrukturen selbst nicht darstellen und gibt z.B. über die noch vorhandene Weite des Gelenkspaltes nur indirekt und sehr global Auskunft über den Zustand von Knorpelbelägen und Menisken. Ganzbeinaufnahmen geben Auskunft über die Beinachsen und ggf. damit verbundene Fehlstellungen im Condylen- und Tibiakopf-Bereich.

Computertomographie (CT)

Die strahlenintensivere Computertomographie kommt nicht in der Primärdiagnostik der Gonarthrose nicht zur Anwendung. Sie kann bei Bedarf Aufschluss über den genauen Zustand des subchondralen Knochens geben, beispielsweise bei der Planung von konturaufbauenden Spongiosaplastiken vor bzw. in Kombination mit autologen Chondrozytentransplantationen.

Magnetresonanztomographie (MRT)

Mit hochauflösenden 3-Tesla Geräten kann der Zustand Gelenkknorpel selbst bereits in den Standard-Wichtungen dargestellt werden. Dezierte Untersuchungen können über die schon weiter oben erwähnten MOCART (Struktur-Analyse), dGEMRIC- und T2/T1rho-Mapping (Biochemie-Analyse) –Protokolle gewonnen werden [53].

Sonographie (Ultraschall)

Die Ultraschall-Untersuchung des Knies spielt im aktuellen klinischen Alltag keine Rolle in der Diagnostik des Arthrosegrades.

Als letzte Möglichkeit der, dann invasiven, Diagnostik und gleichzeitig auch als eine (limitierte) Therapiemöglichkeit ist die Gelenkspiegelung (Arthroskopie) zu nennen.

Arthroskopie

Die Gelenkspiegelung des Knies erlaubt im Rahmen eines mittlerweile zur flächendeckenden Routine gehörenden operativen Eingriffs eine exakte, geeignete und zuverlässige Beurteilung des Gelenkknorpels hinsichtlich Größe (Fläche), Tiefe und Lokalisation eines über Kamera und Optik nur leicht vergrößert dargestellten, makroskopisch erkennbaren Schadens. Isoliert zur Diagnostik wird sie nur selten durchgeführt, sondern ist in der überwiegenden Anzahl der Fälle mit geplanten intraartikulären Maßnahmen vergesellschaftet.

Knorpelschäden am Knie betreffen viele Menschen und haben neben dem subjektiven Leidensdruck auch eine hohe sozioökonomische Relevanz. Unbehandelt neigen Knorpelschäden fast immer zur Verschlechterung im zeitlichen Verlauf [54]. Dies führt in der Regel spätestens im Vollbild der Gonarthrose zur Notwendigkeit der Implantation eines künstlichen (Teil)Ersatzes des Kniegelenks um die Mobilität, Lebensqualität und Leistungsfähigkeit der Betroffenen zu erhalten oder wiederherzustellen. Um akute Schmerzen und Funktionsausfälle oder die Ausbildung einer weitergehenden Arthrose nach Möglichkeit zu beseitigen oder zeitlich zu verzögern wurden mehrere Verfahren der Knorpelzellbehandlung entwickelt, die vor allem bei lokal begrenzten, fortgeschrittenen (Stadium III und IV nach Outerbridge) Knorpelschäden zur Anwendung kommen [55].

Hierzu gehört neben der seit langem bekannten lokalen Mikrofrakturierung der Kortikalis im betroffenen Gelenkbereich zur Induktion der Ausbildung von Regenerat-Faserknorpel auch die Transplantation von Knochen-Knorpelzylindern aus weniger belasteten Bereichen des betroffenen Gelenks (kurz OATS: „osteochondral autologous transplantation“ oder auch „Mosaikplastik“ genannt) [56]. Bei der OATS besteht aber aufgrund der nur begrenzt zur Verfügung stehenden Spenderareale eine Limitierung in der behandelbaren Ausdehnung (Fläche) eines Knorpelschadens. Es wurden daher weitergehend Methoden im Sinne der Autologen Chondrozytentransplantation (ACT) entwickelt, die nicht der Entnahme von Knochen-Knorpel-Zylindern und den damit einhergehenden neuen Schäden bedürfen und die auch für die Behandlung größerer Defektflächen geeignet sind. Die ACT kann hierbei ebenfalls gute Langzeitergebnisse aufweisen [57,58,59,60]. Auch die Rückkehr in Sportarten mit hohen Beanspruchungen des Knies wie zum Beispiel Fußball ist nach Durchführung moderner Therapie-Formen wieder möglich [61].

Eine stete Weiterentwicklung und Verfeinerung der Methoden der ACT, auch hinsichtlich der vorhandenen Träger-Substanzen, findet anhaltend statt [62]. Aktuelle Leitlinien in der Auswahl der geeigneten Behandlungsmethode bestehen [63].

Alle genannten Therapie-Verfahren kommen meistens erst bei manifesten, klinisch Beschwerden verursachenden Schäden des Gelenkknorpels zum Einsatz. Hierbei ist zu beachten, dass leichte Knorpelschäden (Stadium I und II nach Outerbridge oder auch Stadium 1 und 2 nach OARSI) oftmals keine klinischen Beschwerden, die zum

Arztbesuch führen würden, verursachen. Wenn diese Schäden in frühem Stadium erkannt werden, sind die therapeutischen Möglichkeiten limitiert. Mechanisch kann eine eventuelle Korrektur der Beinachse bei Eignung (Varus- oder Valgusstellung mit isoliertem Schaden und klinischen Beschwerden im vermehrt belasteten Gelenkkompartiment; operativ oder konservativ mit Hilfe orthopädischer Hilfsmittel wie Einlagen, Schuhzurichtungen und Orthesen) erfolgen. Medikamentös existieren neben der reinen Analgesie bei spezifischen Krankheitsbildern (v.a. aus dem rheumatologischen Formenkreis) Möglichkeiten des Einsatzes von Disease modifying Osteoarthritis Drugs (DMOAD), der orale Einsatz sogenannter Symptomatic slow acting drugs in Osteoarthritis (SYSADOA) wie z.B. Glukosamin oder Chondroitinsulfat oder der Einsatz von Kortikosteroiden in systemischer und lokal intraartikulär applizierter Form.

Darüber hinaus werden intraartikuläre Injektionen mit Thrombozyten-reichem-Plasma (platelet rich plasma, PRP) und Hyaluronsäure-Präparaten durchgeführt. Für beide Verfahren konnte ein jeweils uneingeschränkt nachvollziehbarer Effekt auf eine Verbesserung klinischer Beschwerden auch in aktuellen Studien und Metaanalysen noch nicht nachgewiesen werden bzw. erscheint ein solcher nur unter Anerkennung einer hohen Bias-Gefahr zur bestehen [64] oder ein positiver Effekt erscheint in Abhängigkeit der Schwere der vorliegenden Arthrose nur gering ausgeprägt zu sein [64,65,66]. Diese beiden Behandlungsverfahren werden daher im Allgemeinen von den gesetzlichen Krankenversicherungen auch nicht übernommen.

Zudem induziert keines der genannten konservativen Verfahren in bereits geschädigtem Knorpelgewebe einen Regenerationsprozess [67].

Insgesamt illustriert der oben geschilderte Sachverhalt, dass früheste OA-Stadien klinisch weder spezifisch diagnostiziert noch gezielt therapiert werden können. In diesem Kontext zeigten frühere Arbeiten, dass die räumliche Organisation superfizieller Chondrozyten als bildbasierter Biomarker für früheste OA-Veränderungen verwendet werden kann. Um die räumliche Organisation zukünftig als ein diagnostisches Tool für die klinische Anwendung etablieren zu können, bleibt die wesentliche Frage offen, wie gut sich die Klassifizierung und/oder Quantifizierung der Organisation der Chondrozyten zur Detektion von (frühen) strukturellen Veränderungen eignet.

1.5 Das Ziel der Arbeit

Die Diagnose früher struktureller Veränderungen im Gelenkknorpel ist nach wie vor ein klinisches Problem. Obwohl sich die räumliche Organisation superfizieller Chondrozyten als ein bild-basierter Marker für die Frühdiagnose struktureller und/oder degenerativer Veränderungen prinzipiell eignet, bleiben relevante Fragen offen, welche in dieser Arbeit beantwortet werden sollten. Das Ziel der Arbeit war, folgende Fragen zu beantworten:

- Wie gut eignet sich die Klassifizierung und/oder Quantifizierung der Organisation der Chondrozyten zur Detektion von (frühen) strukturellen Veränderungen, gemessen anhand der Rasterelektronenmikroskopie und nachfolgend der Texturanalyse der gewonnenen Bilder?
- Wie global ähnlich oder lokal variabel sind Veränderungen der Chondrozyten-Organisation im Vergleich zu rasterelektronenmikroskopisch gewonnenen Daten? Sind lokale Betrachtungen der Chondrozyten-Organisation ausreichend, um globale strukturelle Schäden zu erkennen?
- Welcher qualitative oder quantitative Parameter der Chondrozyten-Organisation eignet sich, um frühe strukturelle Veränderungen zu erkennen und korreliert dieser Parameter mit Textur-Analyse-Parametern der rasterelektronenmikroskopisch gewonnenen Bilder?
- Wie früh treten Veränderungen der Chondrozyten-Organisation im Vergleich zu visuellen Klassifikationen oder im Vergleich zu strukturellen Oberflächenschäden der Knorpeloberfläche, erfasst in der Rasterelektronenmikroskopie, auf?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurde explizit der Vergleich von Proben mit strukturell intakten Oberflächen vs. Oberflächen mit Fibrillationen als Testsystem für früh-osteoarthritische Veränderungen verwendet.

2. Material und Methoden

2.1 Probenmaterial

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Knorpelgewebe von medialen und lateralen humanen Femurcondylen verwendet. Das Gewebe wurde nach entsprechender Aufklärung und Einverständniserklärung der Patienten im Rahmen der operativen Implantation von Kniegelenkendoprothesen in der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen gespendet. Die Genehmigung zur Verwendung der Proben lag seitens der zuständigen Ethikkommission der Universität Tübingen vor.

Insgesamt wurden 18 Knorpelproben von sieben verschiedenen Gewebespendern im Alter zwischen 53 und 77 Jahren verwendet. Bei den verwendeten Abkürzungen handelt es sich nicht um die Namenskürzel der Donoren, sondern um willkürlich gewählte Buchstabenkombinationen. Alle Gewebe wurden mit positivem Ethikvotum der zuständigen Ethikkommission und schriftlichem Einverständnis der Gewebespenden gewonnen (171/2014BO2).

Lfd.Nr.	Geschlecht	Alter	Anzahl Proben	Proben-Bez.
1	w	71 Jahre	2	ADB1
				ADC1
2	w	73 Jahre	3	EHA1
				EHB1
				EHC1
3	w	77 Jahre	1	ESA1
4	m	53 Jahre	3	HSA1
				HSB1
				HSC1
5	w	75 Jahre	3	LKA1
				LKB1
				LKC1
6	w	67 Jahre	3	MRA1
				MRB1
				MRC1
7	w	73 Jahre	3	UZA1
				UZB1
				UZC1

Tab. 1: *Verwendete Gewebespenden*

2.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe	Laboport, Neuberger, Freiburg/D
LSM 510 META Laser Scanning Mikroskop mit ApoTome	Carl Zeiss GmbH/D
Magnetrührer (IKAMAG® RCT)	IKA® Labortechnik, Staufen i.Br./D
Pipettierhilfe pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt/D
Schüttler (Vibrax VXR basic)	IKA® Labortechnik, Staufen i.Br./D
Sterilbank	BDK; Luft- und Raumtechnik GmbH/D
Vortexer (Reax top)	Heidolph Instruments GmbH/D

Tab. 2: *Verwendete Geräte*

2.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Chambered Coverglass (1-Well, 8,6cm ²)	Lab-Tek® II, Rochester/USA
Eppendorf-Cups (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Eppendorf, Hamburg/D
Minisart® sterile Filtereinheiten 0,2µm	Sartorius, D
Objektträger (Super Frost plus, 25x75x1,0mm)	Langenbrinck, Emmendingen/D
Petrischalen (Cellstar, 94/16mm, steril)	Greiner, Nürtingen/D
Pinzetten	Fa. Aesculap, Tuttlingen/D
Pipetten:	
· Serological Pipet (2, 5, 10, 25ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes/USA
· Research plus (0, 5, 10, 100, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg/D
Skalpell	FEATHER Safety Razor Co.,Ltd/Japan
Test-Röhrchen (PP test tubes; 15ml, 50ml)	Sarstedt, Nümbrecht/D; Greiner, D

Tab. 3: *Verwendetes Verbrauchsmaterial*

2.4 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Hersteller
Ampuwa®	Fresenius Kabi, Bad Homburg/D
DMEM (contains 25mM HEPES)	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Dulbecco's PBS: Phosphate buffered saline (without Ca & Mg)	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt/D
Glutaraldehydlösung (3%)	Merck KGaA, Darmstadt/D
Paraformaldehydlösung (4%)	Merck KGaA, Darmstadt/D
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D
Triton® X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/D

Tab. 4: *Verwendete Chemikalien und Reagenzien*

2.5 Software

Software	Herausgeber
Adobe Photoshop CS3 Extended	Adobe Systems Incorporated, USA
Axio Vision 4.8.	Carl Zeiss GmbH, D
Fiji	Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V., D, Open Source Software
ImageJ	National Institutes of Health, USA
Microsoft Office	Microsoft Corporation, USA
R	R Foundation for Statistical Computing, Open Source Software
KS	Open Source Software für R Foundation for Statistical Computing, Editor: Duong, Tarn
Scatterplot 3D	Open Source Software für R Foundation for Statistical Computing, Editor: Ligges, Uwe
Spatstat	Open Source Software für R Foundation for Statistical Computing, Editor: Baddeley, Adrian
Sigma Plot	Systat Software Inc., USA

Tab. 5: *Verwendete Software*

2.6 Methoden

2.6.1 Workflow – Schema

Die Gewinnung und Aufarbeitung der Proben erfolgte gemäß folgendem Schema:

1. Transport der Proben aus dem OP in DMEM-Lösung in das Labor
2. Makroskopische Beurteilung und Einteilung der Knorpelschäden in verschiedenen Arealen
3. Gewinnung von Proben mittels Skalpell, incl. Bezeichnung der Probe, Schnitt in unverwechselbarer Trapez-Form zur Unterscheidung „Gelenkoberfläche“ und „Schnittfläche“ (, die nicht untersucht werden sollte)
4. Zellkernfärbung anhand Propidiumiodid
5. Fluoreszenz-Mikroskopie incl. Erzeugung von Bild-Panoramen
6. Anschließend Versand aller Proben nach Kiel
7. Rasterelektronen-Mikroskopie am Anatomischen Institut der Universität Kiel durch Prof. Dr. B. Kurz
8. Bildbearbeitung mittels Photoshop mit dem Ziel einer exakten Übereinanderlagerung der Fluoreszenz- und Elektronen-Mikroskopischen Bilder und Rasterung zur Erzeugung von sog. „Kacheln“
9. Analyse der Elektronenmikroskopischen Kacheln mit Fiji (Image J) zur Gewinnung von Elektronenmikroskopischen Messparametern
10. Analyse der Fluoreszenzmikroskopischen Kacheln mit Fiji (Image J), R und SpatStat zur Gewinnung von Fluoreszenzmikroskopisch-räumlichen Messparametern
11. Analyse der Parameter durch eine **lokale, Kachel-basierte** (n = 781) und eine **globale, Proben-basierte** (n=18) Auswertung

2.6.2 Gewinnung der Proben und Makroskopisch Visuelle Klassifizierung des Schädigungsgrades

Es wurden die durch die Sägeschnitte abfallenden Femurcondylen von 7 unterschiedlichen Gewebespendern, die bei entsprechender klinischer und radiologischer Kniegelenksarthrose eine Kniegelenk-Total-Endoprothese (K-TEP) erhielten, verwendet.

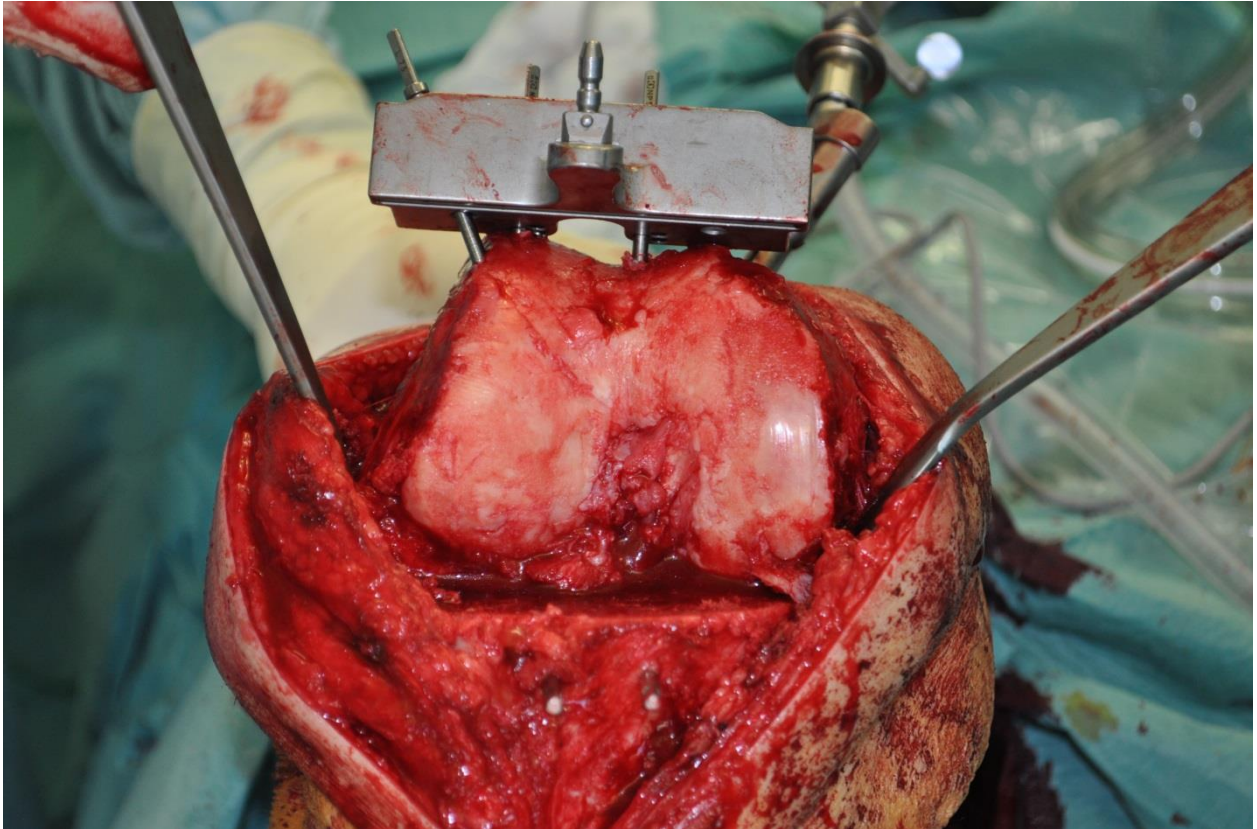


Abb. 9: *Humanes Knie intraoperativ vor distalem Sägeschnitt der Femurcondylen*

Für den Transport ins Labor wurden die Kondylen steril in DMEM-Lösung gelagert und gekühlt.



Abb. 10: *Condylen in DMEM-Lösung im Transportbehälter*

Die Condylen wurden nach Erhalt aus dem OP im Labor innerhalb von 48 Stunden zunächst makroskopisch-visuell begutachtet. Die mit dem bloßen Auge sichtbaren Knorpelbeläge jeder einzelnen Femurcondyle wurden (soweit noch Knorpel vorhanden war) jeweils intraindividuell soweit möglich entsprechend ihrer augenscheinlichen Schädigung in 3 Schweregrade eingeteilt. Hierbei verwendeten wir eine eigene an Outerbridge 1961 [68] und die International Cartilage Regeneration & Joint

Preservation Society (ICRS) mit Sitz in Zürich, Schweiz angelehnte Klassifikation [69,70]:

- Grad 1: visuell glatte oder nahezu glatte Oberfläche ohne Rissbildungen oder Anzeichen wesentlicher Schädigung
- Grad 2: partiell oder durchgehend aufgeraute Oberfläche, ggf. einzelne Rissbildungen, geringer bis mäßiger Verlust an Knorpelsubstanz / -dicke
- Grad3: zusammenhängend stark aufgeraute Oberfläche mit deutlichen Substanz- bzw. Dickenverlust, auch mit herausgelösten Fasern

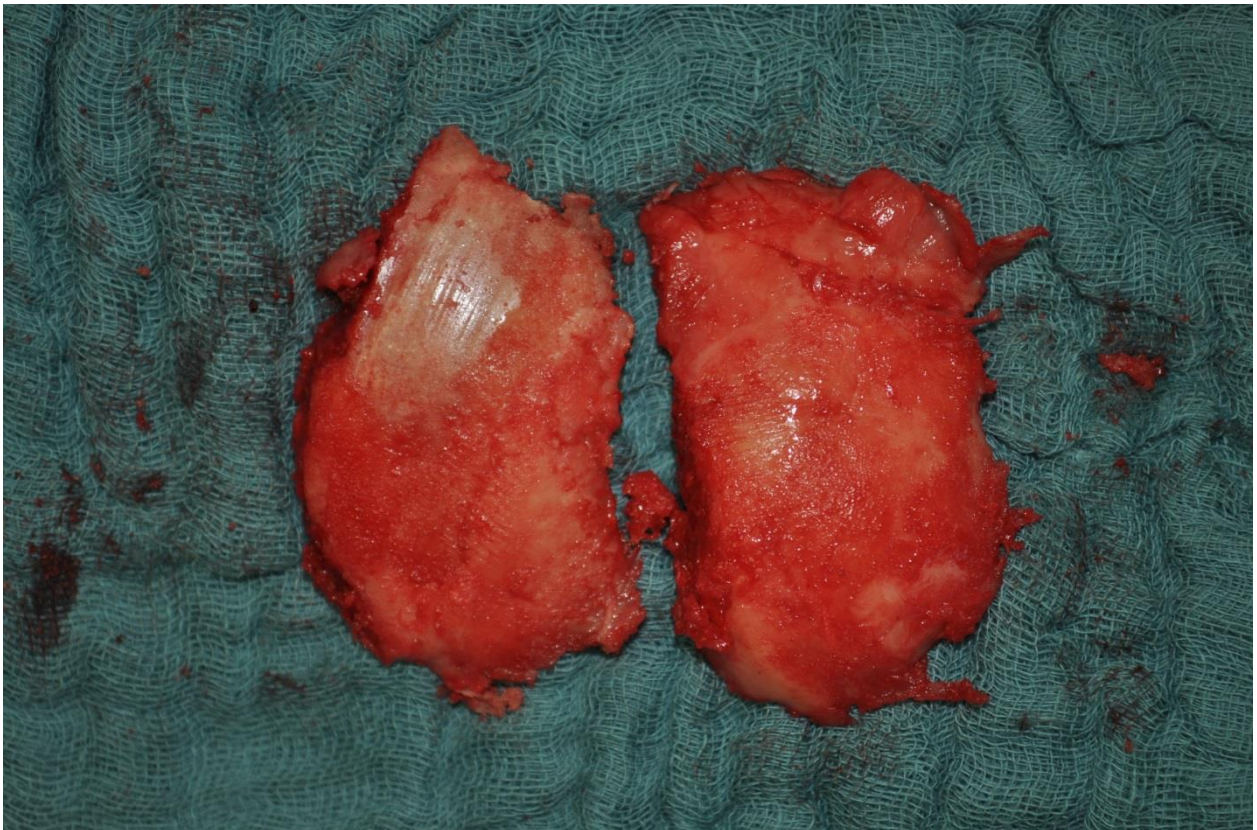


Abb. 11: *Femurcondylen bei makroskopisch-visueller Betrachtung*; in diesem Beispiel überwiegende Einteilung in Schädigungsgrad 3, partiell auch 2; ebenfalls zu erkennen: Knochenglatze ohne Knorpel (oben links)

Aus jedem markierten Schädigungsbereich wurde eine Knorpelprobe von ca. 1x1cm Größe am Knochen tangential mit dem Messer abgetrennt und nachfolgend in die Form eines rechtwinkligen Trapezes geschnitten. Diese äußere Form lässt eindeutigen Rückschluss darauf zu, ob man die zu untersuchende gelenkseitige Oberfläche der Probe oder die knochennahe Schnittseite der Probe betrachtet. Wenn man die Probe fälschlicherweise von schnittseitig betrachten würde, so ließe sich die äußere Form nie mit der definierten Form in Deckung bringen.

Es erfolgte die Definition, dass bei der in Abbildung 12 gezeigten Ansichtweise der Betrachter die Gelenkseite der Probe und nicht die Schnittseite ansieht.

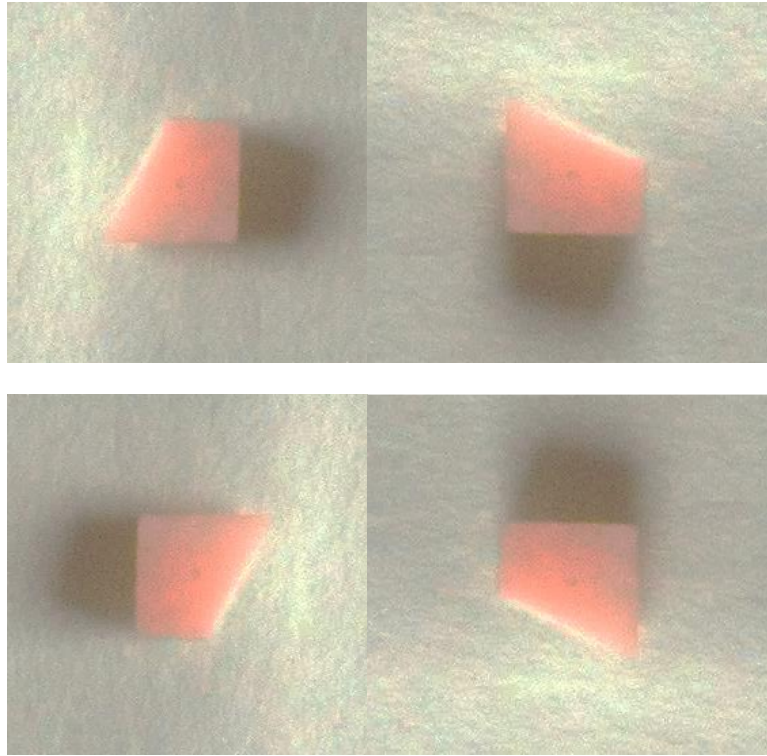


Abb. 12: Ausgeschnittene Knorpelprobe in Form eines rechtwinkligen Trapezes. Jeweils um 90° gedreht. Nach Definition dieser Form besteht immer Klarheit über die betrachtete Seite der Knorpelprobe (Gelenkseite)

Das so gewonnene Probenmaterial wurde bis zur Weiterverarbeitung in mit PBS 9:1 verdünnter Formaldehydlösung (37%) befüllten Eppendorf Cups aufbewahrt.

2.6.3 Nukleusfärbung

Nach Entnahme aus den Cups wurden die Proben je zweimal für ca. 5min in PBS gewaschen. Um die Zellwände der Chondrozyten für die folgende Zellkernfärbung mit Propidiumiodid durchlässig zu machen – es durchdringt aufgrund geringer Membranpermeabilität dabei nur die Zellwand von toten Zellen -wurden die Proben zunächst für 15 Minuten mit einer Permeabilisierungslösung (0,1% Triton X-100 in PBS) behandelt. Anschließend wurden die Proben in reichlich PBS-Lösung über mindestens 72 Stunden im Warmwasserbad (37°) ausgewaschen. Nach Entnahme aus dem Wasserbad erfolgten weitere zwei Spülungen der Proben in PBS über je 10 Minuten.

Propidiumiodid, ein dunkelrotes, kristallines und wasserlösliches Pulver, ist ein fluoreszierender DNA-Farbstoff, der mittels sichtbaren Lichts angeregt werden kann und hierunter verhältnismäßig langsam ausbleicht. Es wirkt als Nucleinsäureinterkalator, d.h. es schiebt sich zwischen DNA-Moleküle ein ohne jedoch diese wesentlich zu verändern. Nach Herstellung einer Propidiumiodid-Stammlösung (10mg Propidiumiodid auf 1ml Ampuwa-Wasser) wurde diese lichtgeschützt in eine Arbeits- und Färbelösung durch Verdünnung mit PBS im Verhältnis 1:1000 weiterverarbeitet. In dieser Lösung wurden die Proben unter lichtgeschützten Verhältnissen für eine Stunde inkubiert und nachfolgend nochmals zweimal in PBS gewaschen.

2.6.4 Fluoreszenzmikroskopie der Knorpelproben

Nach der Färbung wurden die Proben einer Fluoreszenz-Mikroskopie (Laser Scanning Mikroskopie) unterzogen. Hierfür wurde das LSM 510 der Firma Zeiss im ApoTome-Modus verwendet.

Die verwendete konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie zeichnet sich im Vergleich mit einem herkömmlichen Fluoreszenz-Mikroskop durch ein deutlich höheres Auflösungsvermögen aus. Zudem ist durch die selektive Erfassbarkeit von höheren und tieferen Schichten in der Bearbeitung die Nivellierung von Niveau-Unterschieden in der Probe („Wellen in der Proben-Oberfläche“) möglich. Dies wird durch eine jeweils konjugiert zur Fokusebene angeordnete Lochblende erreicht. Mit einem Laserstrahl wird die Probe punkt- und zeilenförmig abgetastet, die Informationen stehen nachfolgend zur digitalen Weiterverarbeitung zur Verfügung.

Durch einen Laserstrahl werden die fluoreszierenden Propidiumiodid-Moleküle angeregt, sie geben entsprechendes Fluoreszenzlicht ab. Durch einen dichromatischen Teilerspiegel können das Anregungslicht und das emittierte Licht voneinander getrennt werden. Das emittierte Licht wird nun über die in konfokaler Ebene befindliche Lochblende, die dafür sorgt, dass nur aus der Fokusebene stammendes Licht, aber kein Streulicht, passieren kann, auf den Detektor geleitet. Diese Information wird entsprechend ihrer Intensität in einen digitalen Wert umgewandelt und an den Computer weitergeleitet.

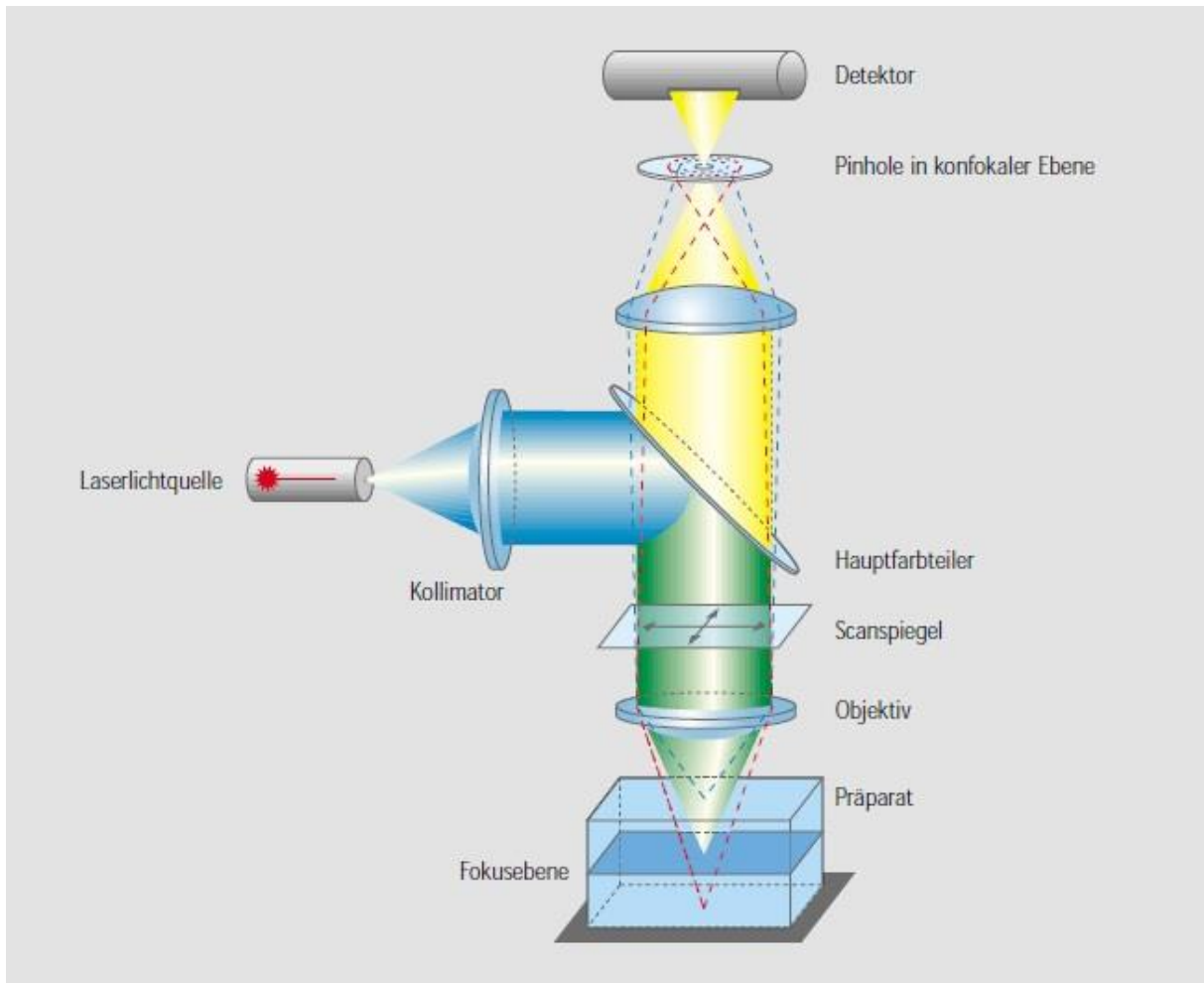


Abb. 13: Prinzip der Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie [71]

Mittels des Zusatzmoduls MosaiX® und einem motorisierten Proben-Tisch kann die viel größere Gesamtfläche der kompletten Probe abgetastet werden.

Zur exakten räumlichen Darstellung wurde bei Aufnahme der Einzelbilder eine 10fache Vergrößerung verwendet. Es wurden bis zu 200 Einzelaufnahmen mit einer Schichtdicke von jeweils $1\mu\text{m}$ angefertigt, was einer Gesamttiefe des dreidimensionalen Bildstapels (sog. „Z-Stack“) von insgesamt $200\mu\text{m}$ entspricht. X- und Y-Achse maßen bei dieser Vergrößerung $900 \times 650\mu\text{m}$.

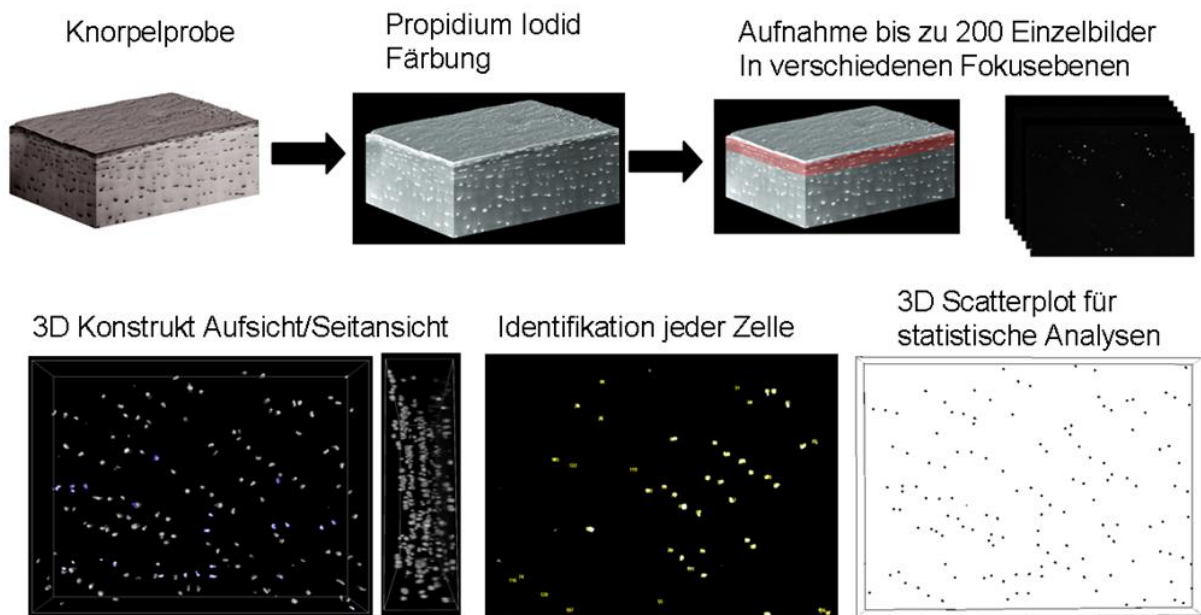


Abb. 14: Schema 3D Datengewinnung und Auswertung [72]

Zur Abbildung wurde ein Sperrfilter für rotes Fluoreszenzlicht gewählt (DsRed; PI: EX/EM: 535nm / 617nm). Im gewählten ApoTome-Modus wurden zur Optimierung der Darstellung strukturierte Beleuchtungsprotokolle (Streifenprojektion) verwendet. Eine Gitter-Struktur mit definierter Liniendicke wird dabei in die Fokusebene der Probe projiziert und in der Folge dreimal seitlich versetzt, wobei pro Position jeweils ein digitales Bild aufgenommen wird. Aus den drei Rohbildern kann die Software nun zur Verbesserung von Kontrast und Auflösung ein fertiges Bild der aufgenommenen Schicht erstellen. Diese Bilder zeichnen sich durch eine nochmalige Reduktion des Einflusses von störenden Artefakten und Streustrahlen aus. Über die Software Axiovision® lassen sich dementsprechend schichtförmige, dreidimensionale Bildstapel erzeugen.

Aus den zu jeweils einem Schicht-Panorama zusammengesetzten Einzelbildern der verschiedenen Fokusebenen lassen sich nun beim Zusammensetzen zu einem Panorama-Bild der Oberfläche der gesamten Probe Niveau-Unterschiede der Oberfläche („Wellen“) ausgleichen, so dass letztendlich eine zweidimensionale, treue Reproduktion der Zellanordnung der obersten Probenschicht möglich ist.

Die folgende Abbildung zeigt beispielhaft drei verschiedene Schichtebenen des Z-Stacks der Probe ADC1. Insgesamt hatte diese Probe 37 solcher Schichten.

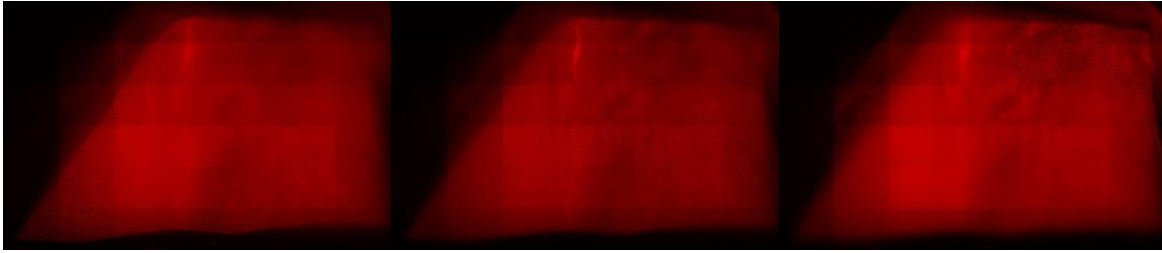


Abb. 15: Z-Stack Bilder 3, 17 und 30 von 37 der Probe ADC1 (von links nach rechts).
Abgebildet ist die Oberfläche der gesamten Knorpelprobe mit einer Größe von ca. 1x1cm.

Durch entsprechende Auswahl der Schichten, in denen die Zellkerne fokussiert abgebildet sind, lässt sich mit Hilfe des AxioVision Moduls „MosaiX“ ein zweidimensionales Panorama-Bild erzeugen.

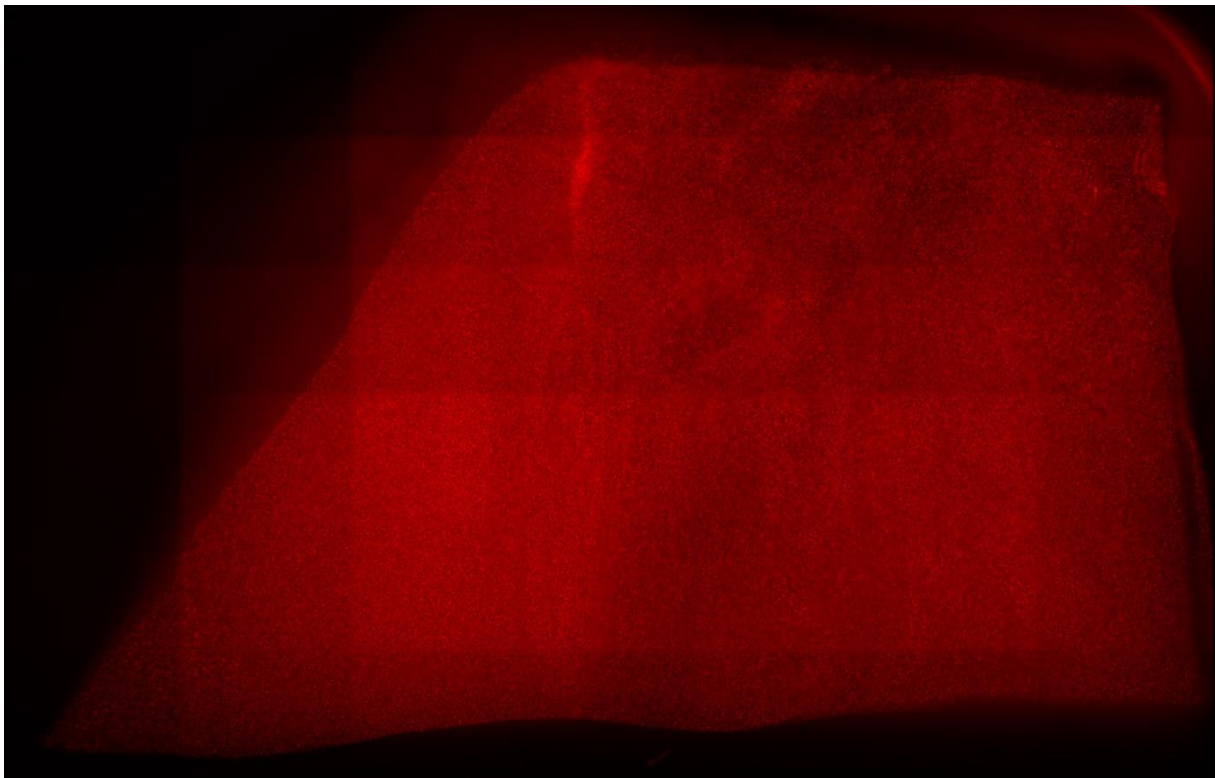


Abb. 16: *Übersichtsbild* Probe ADC1. Abgebildet ist die Oberfläche der gesamten Knorpelprobe mit einer Größe von ca. 1x1cm.

Die Klassifikation der Organisation erfolgte, indem jede einzelne Kachel individuell klassifiziert wurde. Die Zuordnung zum jeweiligen räumlichen Organisationsmuster erfolgte dabei zum in der Kachel überwiegenden Muster. Auf diese Weise wurden alle Kacheln einer Probe klassifiziert. Die Organisation der gesamten Probe wurde bestimmt, in dem alle Muster numerisch kodiert wurden (1: Strings; 2: Double Strings; 3: Cluster; 4: diffuse Verteilung; 5: zellfreie Areale) und der Durchschnittswert der Muster für jede individuelle Probe errechnet wurde. Darüber hinaus wurde der

prozentuale Anteil eines jeden Musters einer Probe berechnet, indem z. B. der Anteil aller Kacheln mit Strings als prozentualer Anteil aller Kacheln einer Probe errechnet wurde.

2.6.5 Rasterelektronenmikroskopie der Knorpelproben

Nach der fluoreszenzmikroskopischen Analyse wurden die Proben an das Anatomische Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (Prof. Dr. Bodo Kurz) versandt. Dort wurden mittels eines Rasterelektronenmikroskops (REM) eine Analyse und Fotodokumentation der Proben durchgeführt.

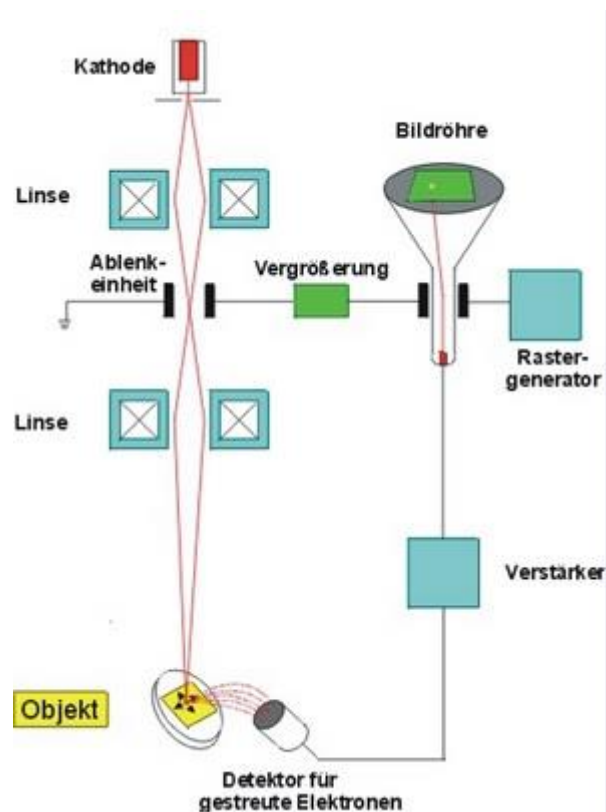


Abb. 17: Schematisches Prinzip der Raster-Elektronen-Mikroskopie [73]

Im Prinzip wird bei der Rasterelektronenmikroskopie im Vakuum ein durch Hochspannung zwischen Kathode und Anode erzeugter Elektronenstrahl sehr fein gebündelt und fokussiert auf das zu untersuchende Objekt gerichtet. Durch den sehr feinen Strahl ist eine punktförmige Abtastung möglich. Über entsprechende Ablenkspulen wird der Punktstrahl rasterförmig in einem x,y-Koordinatensystem über die Oberfläche des Objektes geführt („gerastert“). Die Elektronen aus dem Punktstrahl

werden beim Auftreffen auf das Objekt abgebremst und geben kinetische Energie an das Objekt ab. Hierdurch kommt es zum Herauslösen u.a. sogenannter Sekundärelektronen. Dieses Signal wird vom Sekundärelektronendetektor aufgezeichnet, verstärkt und entsprechend der Signalstärke auf einem synchron geschalteten Monitor dargestellt. Hierdurch lässt sich ein stark vergrößertes Abbild der Objektoberfläche darstellen. Diese Untersuchungen wurden in dem Anatomischen Institut der Universität Kiel (Prof. Dr. Bodo Kurz) angefertigt.

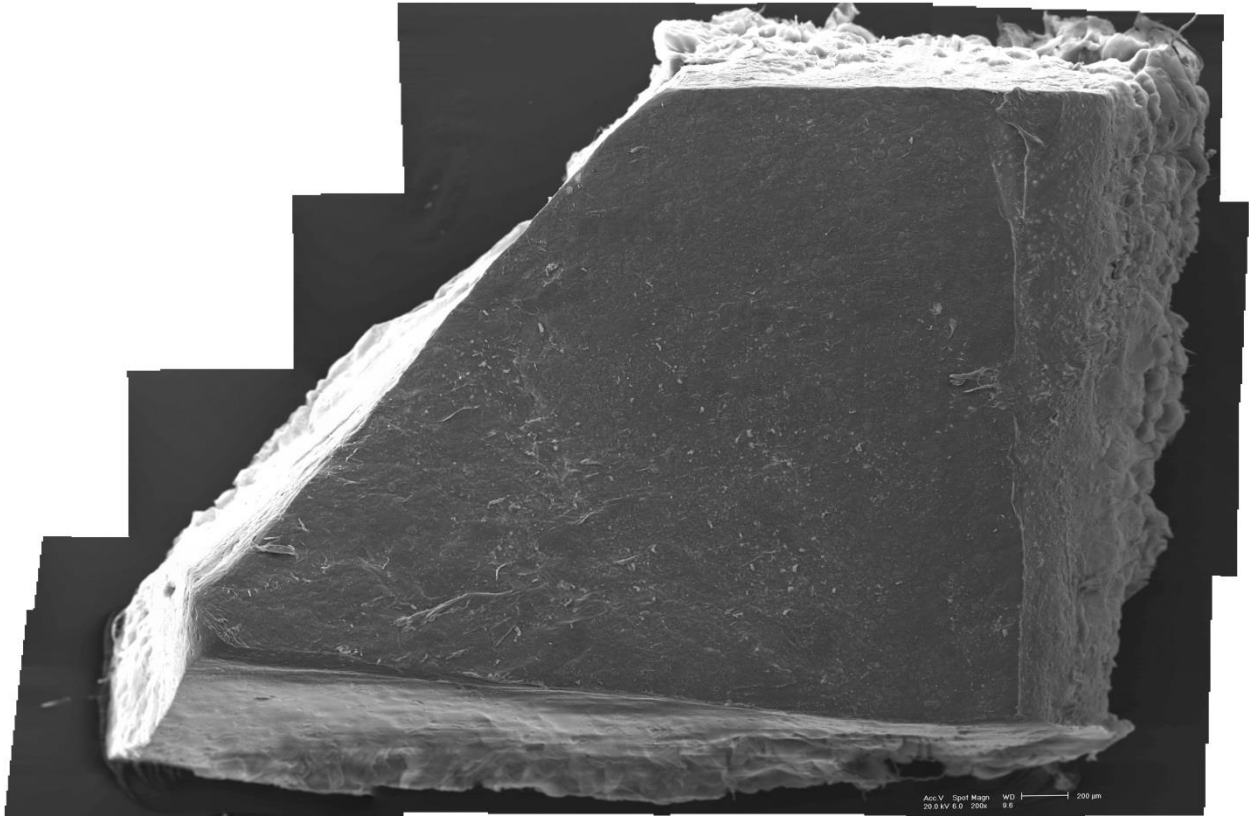


Abb. 18: REM-Panorama (auch REM global) der Probe UZA1. Abgebildet ist die Oberfläche der gesamten Knorpelprobe mit einer Größe von ca. 1x1cm.

2.6.6 Aufarbeiten der Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopischen Aufnahmen einer Probe

Die erzeugten Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopischen Bilder einer Probe, die jeweils im .TIF-Format vorlagen, wurden mit Photoshop CS3 weiterbearbeitet.

Hierbei wurde zur Referenzierung zunächst eine Bildgröße von je 300ppi festgelegt, dann das jeweilige fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Bild über die Ebenen-Funktion in Photoshop übereinander abgelegt und mittels der entsprechenden Werkzeuge zur Deckung gebracht.

Dazu wurde zunächst das REM-Bild einer Probe als tiefste Ebene in Photoshop abgelegt.

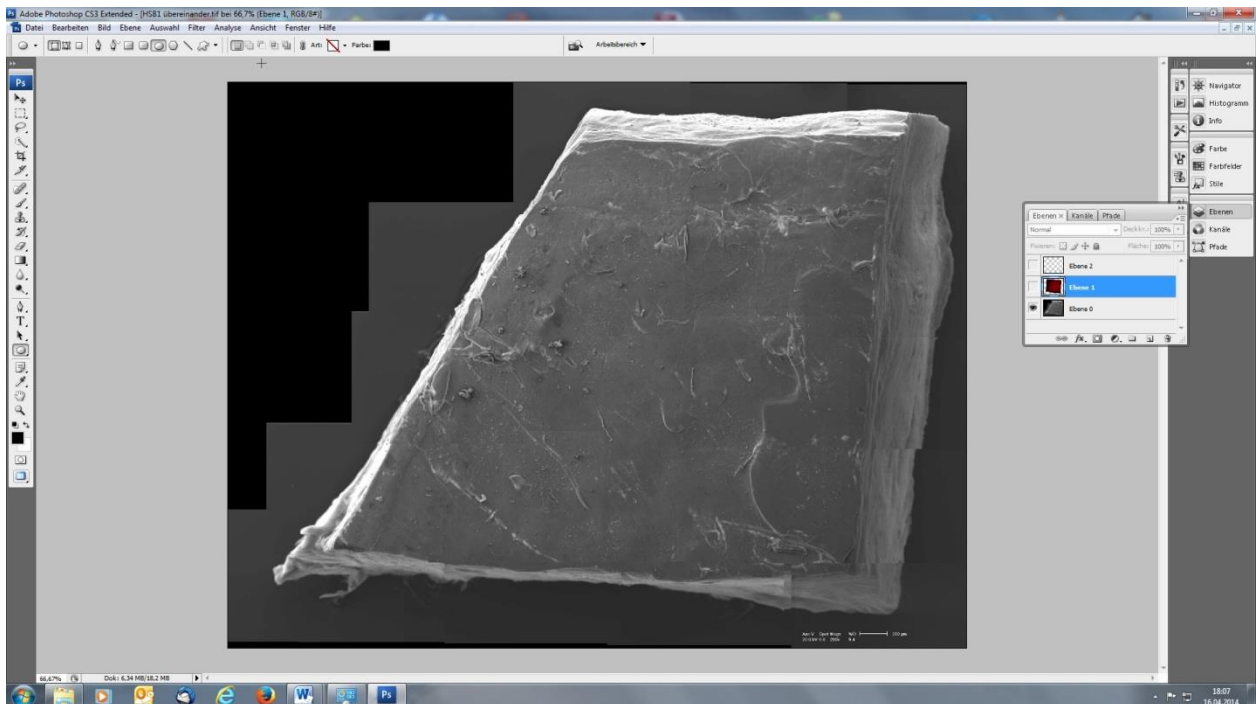


Abb. 19: Ausgangs-REM-Bild der Oberfläche einer Knorpelprobe. (hier beispielhaft Probe HSB1)

Dann wurden in einer weiteren Ebene die Ränder der Probe markiert.

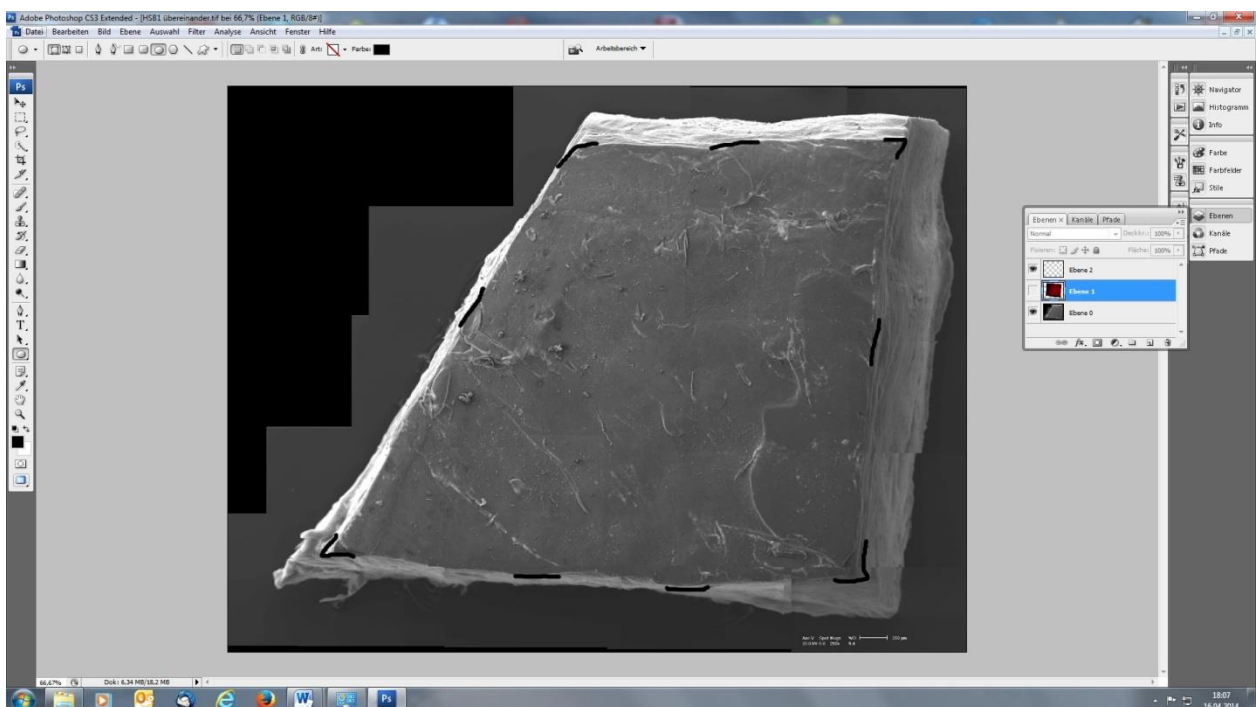


Abb. 20: Markierung der Grenzen der Probenoberfläche

Nun konnte in einer dritten Ebene das Fluoreszenzmikroskopische Bild passgenau über dem Elektronenmikroskopischen Bild abgelegt werden. Hierzu wurden auch Werkzeuge wie „Transformieren“ verwendet, um zum Beispiel leichte Schrumpfungen und Verziehungen der Proben zwischen Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopischer Aufnahme, z.B. bedingt durch Bearbeitung, Transport oder Austrocknung, ausgleichen zu können.

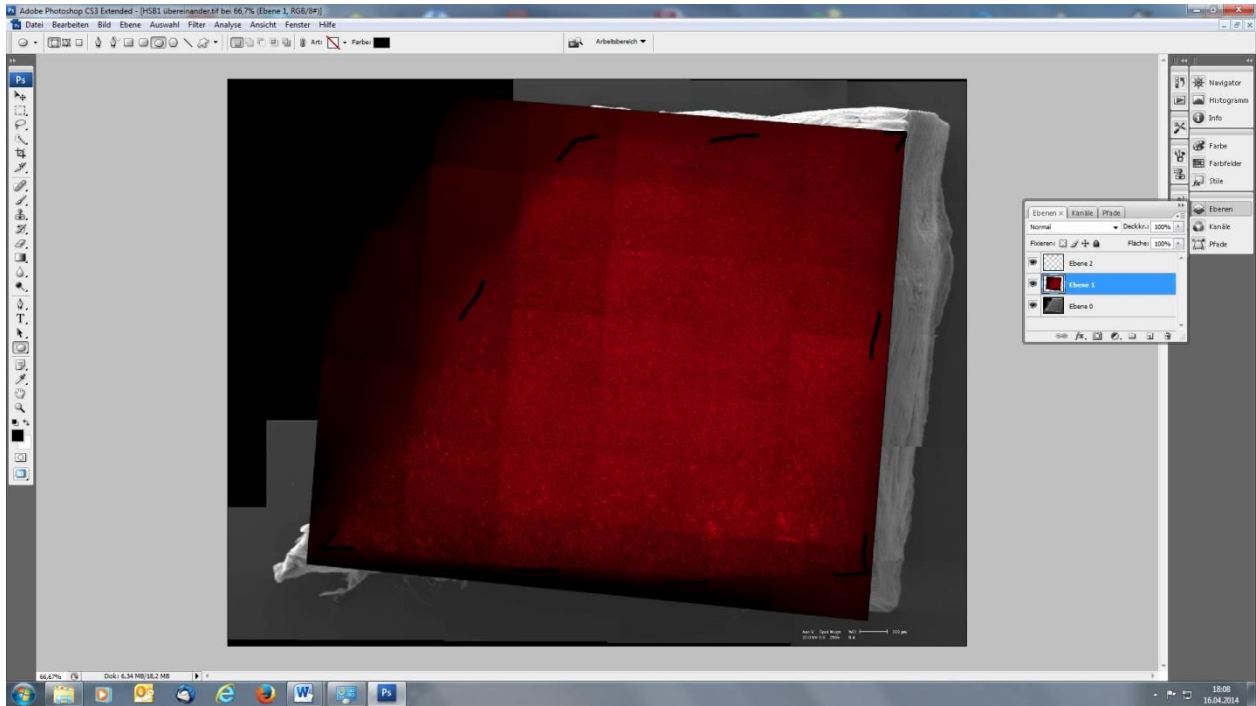


Abb. 21: *Übereinanderlagerung der REM- und der Fluoreszenzmikroskopischen Ebenen*

Die Umrandungsmarkierungen konnten nun entfernt werden, es erfolgte eine freie, willkürlich eingeteilte Rasterung mittels paralleler bzw. orthogonal zueinander liegender Linien. Diese Rasterung orientierte sich hierbei nur an den „Klebestellen“, die beim Zusammenfügen der Fluoreszenzmikroskopischen Panoramabilder durch die MosaiX-Software entstanden waren.

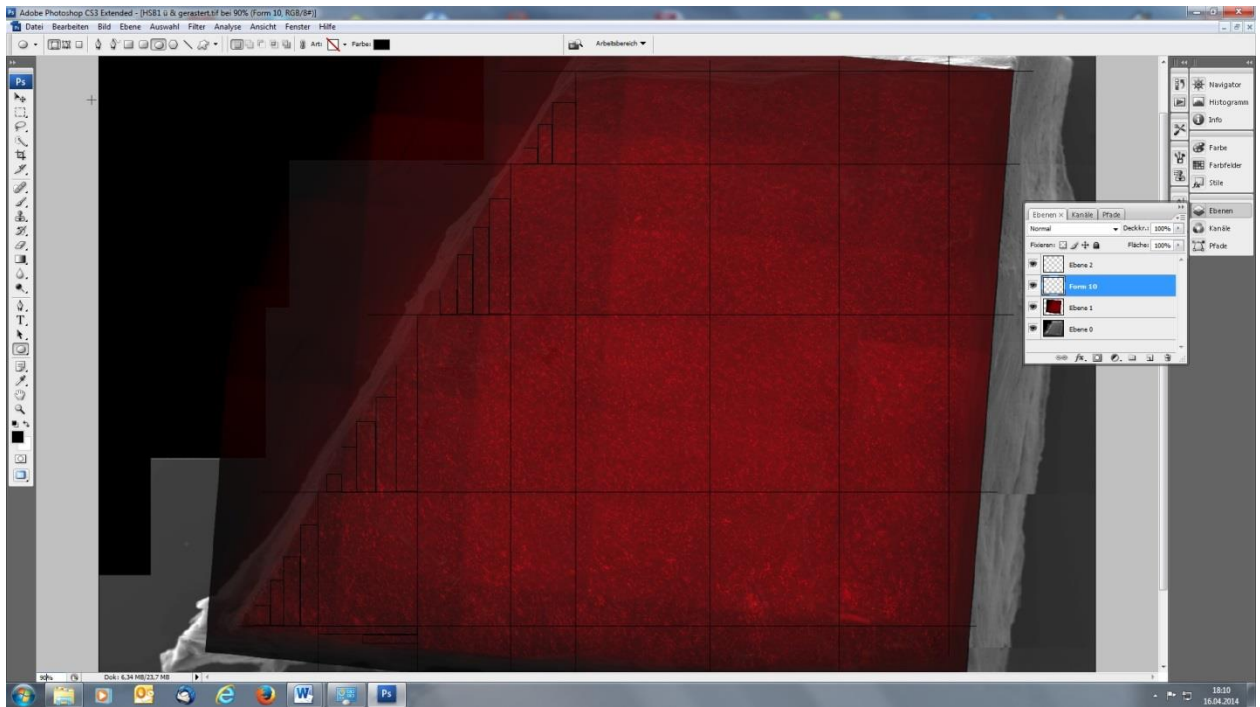


Abb. 22: Einzeichnung von „Regions-of-interest“. (ROI, sog. „Kacheln“, diese werden im weiteren Verlauf auf als „lokale“ Betrachtungsweise benannt)

Nun wurden die so kreierten „Kacheln“ jeder einzelnen Probe nummeriert. Je nach Probe wurden so zwischen 30 und 60 verschieden große „Kacheln“ erzeugt, insgesamt über alle 18 Proben hinweg 781 Kacheln.

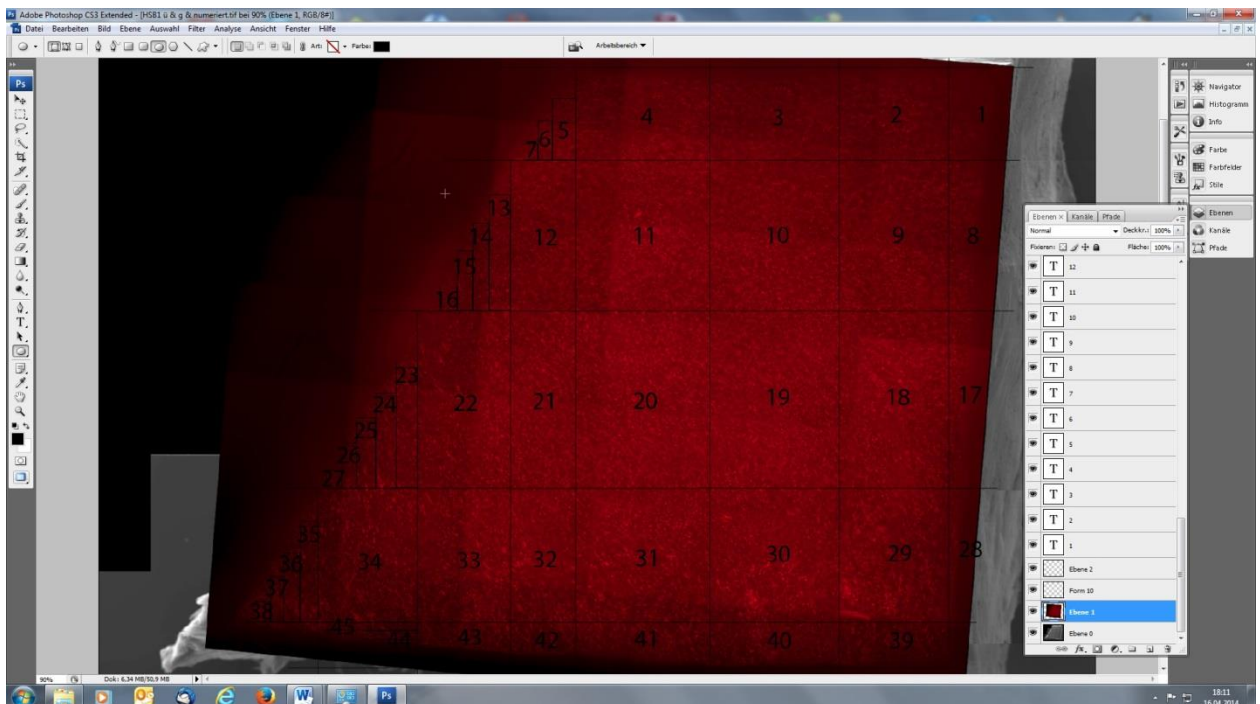


Abb. 23: Nummerierung der Kacheln

Die jeweils identische fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Kachel wurde jeweils separat ausgeschnitten und zur Weiterverarbeitung gespeichert.

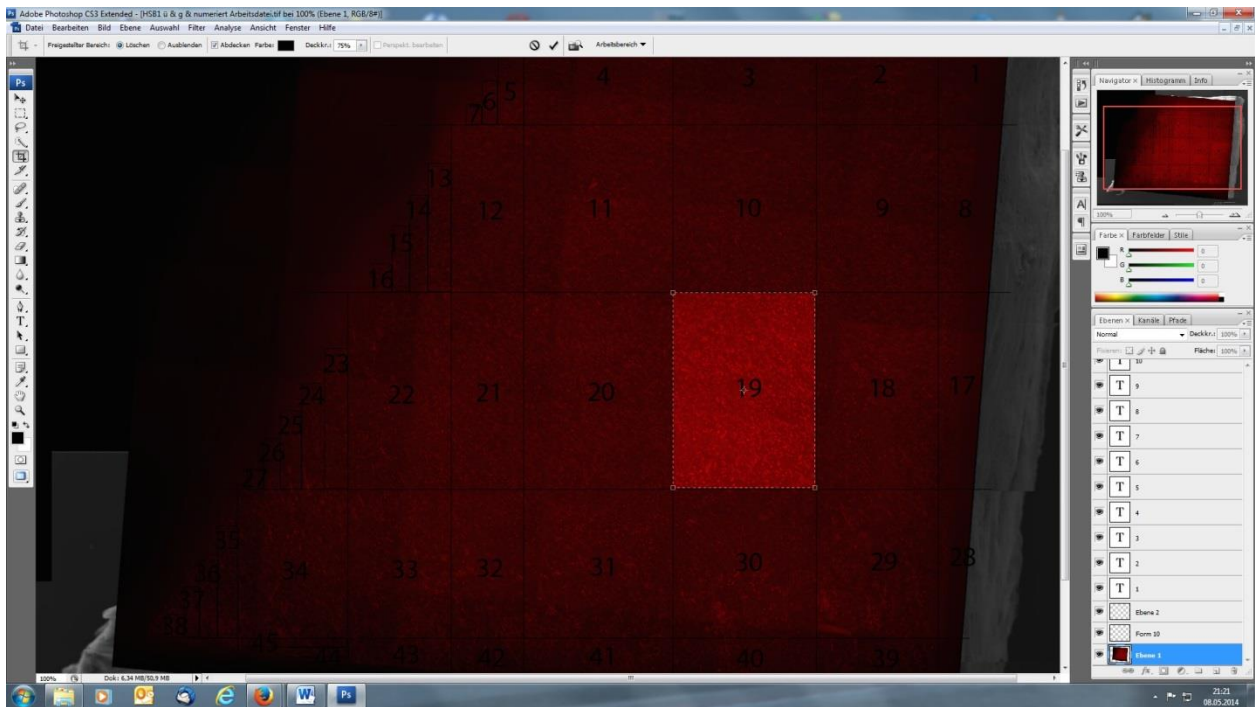


Abb. 24: Ausschneiden einer einzelnen Kachel für die subsequente Analyse

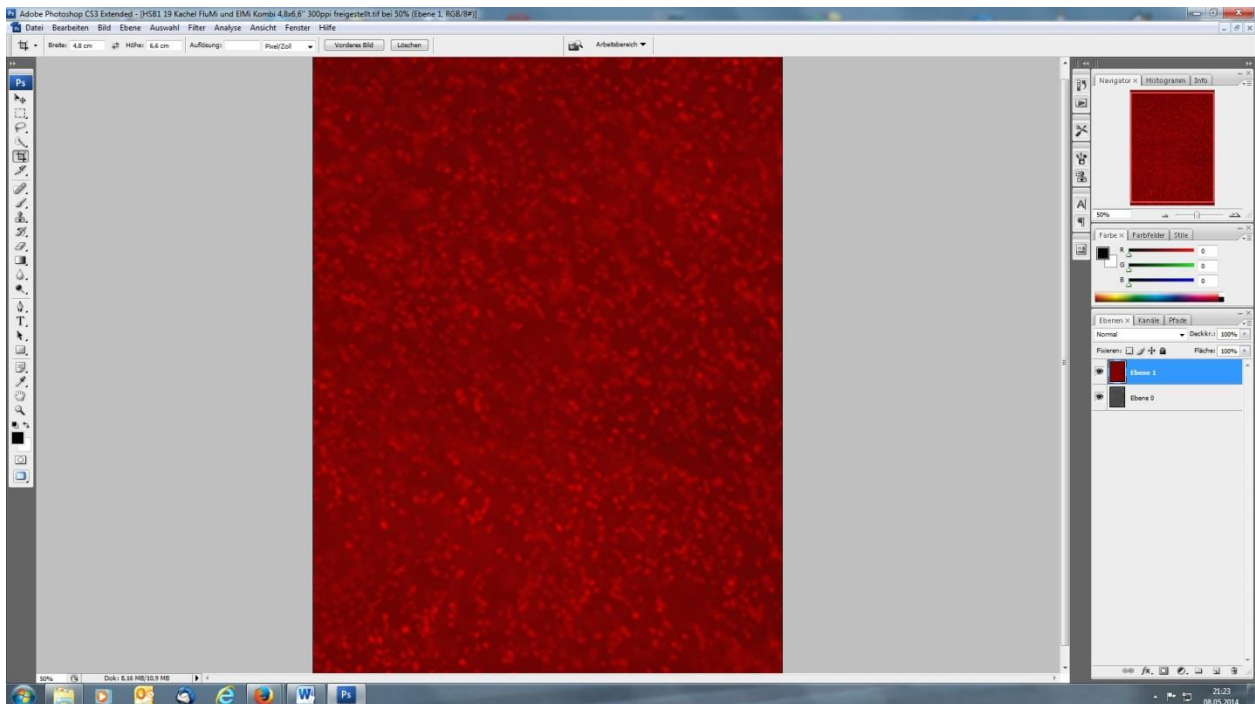


Abb. 25: Übereinander liegende Elektronen- und Fluoreszenzmikroskopische Bildinformation einer Kachel

Hierzu wurde jede einzelne Kachel mit den übereinanderliegenden Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopischen Bildinformationen mit dem Freistellungswerkzeug entsprechend ihrer jeweiligen Größe separiert. Anschließend wurde jeweils die Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopische Ebene von der anderen getrennt und isoliert gespeichert, wobei das Elektronenmikroskopische Bild für die weitere Verarbeitung von einem 8-bit-RGB-Farbbild in ein 8-bit-greyscale-Bild umgewandelt wurde.

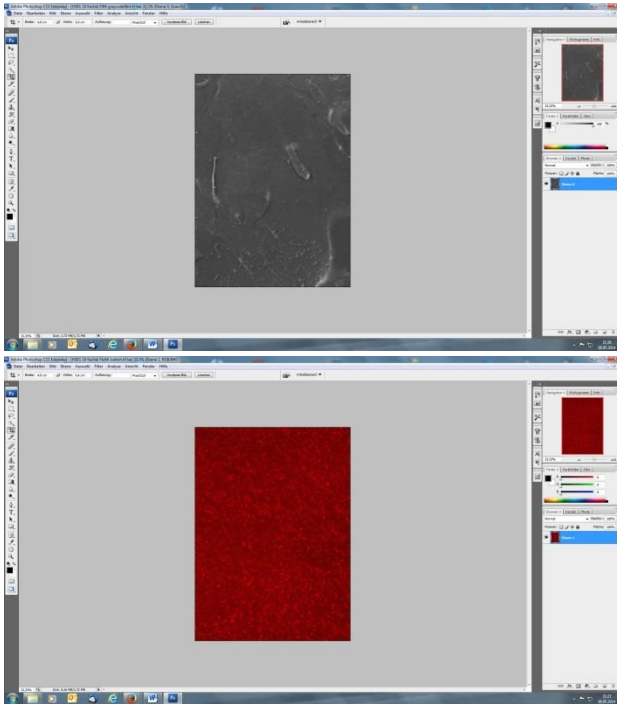


Abb. 26: *Separierte Elektronen- und Fluoreszenzmikroskopische Bildinformation der gleichen Kachel* (in diesem Fall gleiche Kachel wie in Abb. 25)

2.6.7 Gewinnung der Daten

2.6.7.1 Elektronenmikroskopische Bildanalyse

Das Elektronenmikroskopische Gesamtbild jeder einzelnen Knorpelprobe wurde nun am Bildschirm visuell dem in der gesamten Knorpelprobe überwiegenden Anteil eines von insgesamt drei Schädigungsgraden zugeordnet (im Weiteren auch „EIMi global“ oder „**REM-global**“ abgekürzt). Analog hierzu wurde jede einzelne Elektronenmikroskopische Kachel dem in der jeweiligen Kachel überwiegenden Schädigungsgrad (im Weiteren auch „EIMi vis/lokal“ oder „**REM-lokal**“ abgekürzt) zugeordnet. Diese Schädigungsgrade wurden wie folgt definiert.

Die Definition der drei Schädigungsgrade in der REM erfolgte dabei wie hier dargestellt:

Grad 1 = Oberfläche ist weitgehend glatt und ohne Diskontinuität

Grad 2 = aufgeraute Oberfläche, leichte Rillen/Fibrillierungen

Grad 3 = Oberfläche ist rau, teilweise diskontinuierlich

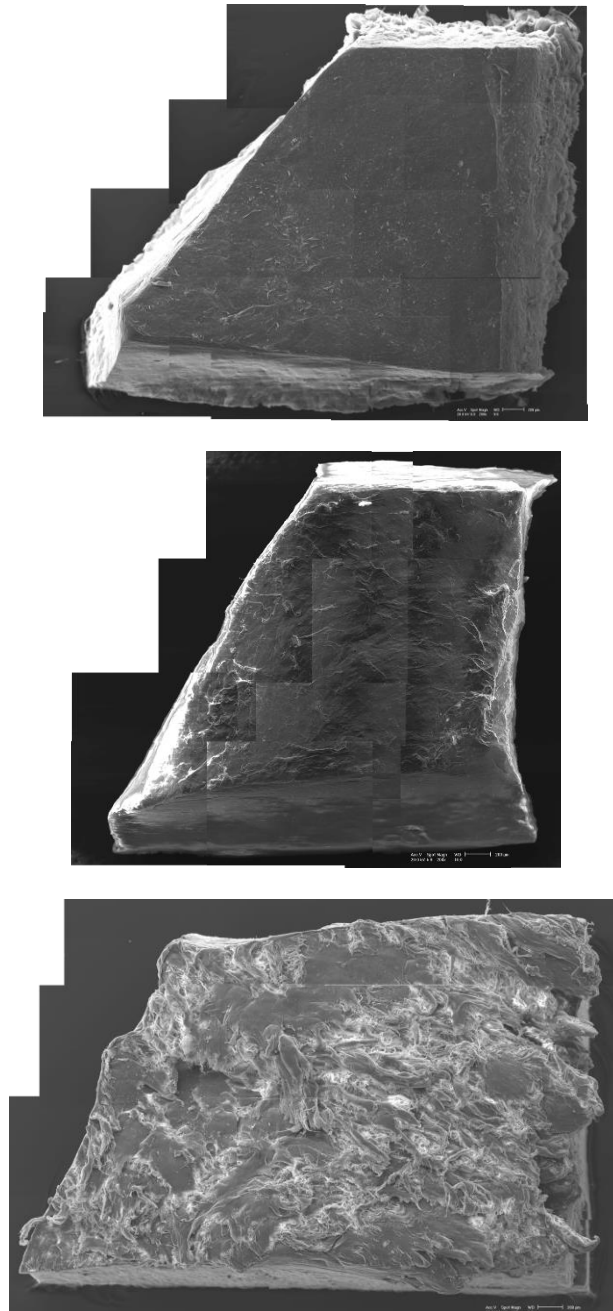


Abb. 27: Globale REM-Aufnahme der drei verschiedene REM-Schweregrade der Schädigung. Probe UZA1 (oben) als Beispiel für eine in Grad 1 klassifizierte Aufnahme, Probe LKA1 (mittig) als Beispiel für eine in Grad 2 klassifizierte Aufnahme und Probe UZC1 (unten) als Beispiel für eine in Grad 3 klassifizierte Aufnahme

Mittels des Programms Fijj (bzw. Image J) wurden die Elektronenmikroskopischen Bildinformationen jeweils weiter aufgearbeitet, so dass schließlich weitere Daten für die statistische Auswertung gewonnen werden konnten.

Textur-Analysen wie die verwendete eignen sich zur Untersuchung und Analyse von Bilddaten [74] und wurden zuvor bereits erfolgreich an Knorpelproben durchgeführt [50]. Jede Elektronenmikroskopische Kachel wurde hierbei in Fiji mittels des GLCM Texture Plugin von Julio E. Cabrera untersucht [75].

Es wurden so folgende Parameter aus den Elektronenmikroskopischen Kacheln berechnet:

Angular Second Moment (ASM):

Das Angular Second Moment ist ein Maß für die Ordnung eines Bildes. Je höher die Ordnung, d.h. je geringer die Grauwert-Abstufung von einem Pixel (Bildpunkt) zum nächsten, desto höher ist das Angular Second Moment [74,76].

Contrast (Con):

Der Contrast ist ein Maß des Kontrastes und spiegelt somit die Anzahl der lokalen Grauwertunterschiede eines Bildes wieder. Ein Bild mit vielen Wechseln von hellen und dunklen Bildpunkten erhält einen hohen Contrast-Wert [74,77].

Correlation (Cor):

Die Correlation ist ein Maß für die lineare Abhängigkeit des Grautons eines Pixels von den Grautönen der daneben befindlichen Pixel. Je zufälliger Unterschiede in den Grauwerten auftreten umso kleiner ist die Correlation [74,78].

Inverse Difference Moment (IDM):

Das Inverse Difference Moment beschreibt das Maß an Homogenität in einem untersuchten Bild und wird im Englischen synonym auch „Homogeneity“ genannt. Je ähnlicher die Grauwerte von Pixeln in einem Bild sind, desto höher die Homogenität [74,79].

Entropy (Ent):

Die Entropy ist ein aus der Thermodynamik hergeleiteter Prozess und beschreibt mittels einer logarithmischen Funktion bei einer Textur-Analyse das Maß der Unordnung (Chaos) eines Bildes [74,80].

2.6.7.2 Fluoreszenzmikroskopische Bildanalyse

Räumliches Verteilungsmuster der Chondrozyten

Jede Fluoreszenzmikroskopische Kachel wurde visuell einzeln bezüglich der überwiegenden räumlichen Chondrozyten-Organisation begutachtet und eingeteilt. Hierbei wurde folgende Einteilung zur Unterscheidung der verschiedenen Verteilungsmuster (auch „Pattern“ genannt) verwendet [51,52]:

- Grad 1: Chondrozyten überwiegend als Single-Strings angeordnet
- Grad 2: Chondrozyten überwiegend als Double-Strings angeordnet
- Grad 3: Chondrozyten überwiegend als kleine und/oder große Cluster angeordnet
- Grad 4: Chondrozyten zeigen überwiegend eine diffuse Verteilung und lassen sich nicht nach Grad 1, 2, 3 oder 5 einordnen
- Grad 5: Große oder überwiegend zellfreie Areale ohne Chondrozyten

Zum besseren Verständnis und zur Vereinfachung der Lesbarkeit darf hierzu auf die detaillierte Darstellung dieser Vorgehensweise und Zuordnung im Kapitel 3.2 verwiesen werden.

Weitergehend wurde jede Fluoreszenzmikroskopische Kachel in Fiji nachfolgend mittels der Find Maxima – Funktion untersucht. So konnte die Lage jedes einzelnen Zellkerns in einem x,y-Koordinaten-System definiert und gespeichert werden. Mittels der „noise tolerance“-Funktion, die für jede Kachel neu angepasst wurde, wurden die durch das Bild-Rauschen verursachten falsch-positiven und falsch-negativen Markierungen von Zellkernen unter 3-maliger visueller Prüfung korrekter Zellmarkierungen händisch auf ein Minimum reduziert.

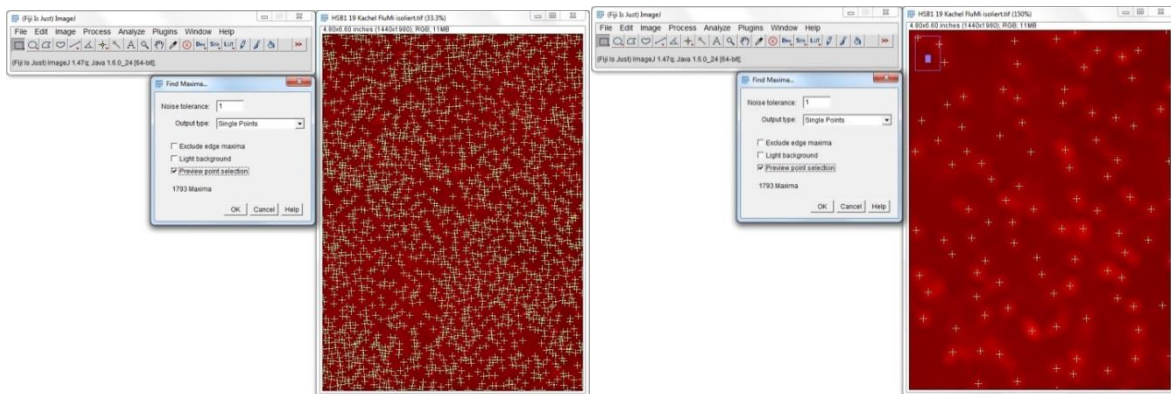


Abb. 28: Bestimmung der besten Markierung der Zellkerne durch die Find Maxima – Funktion unter Vergrößerung und Anpassung der „noise tolerance“ (in diesem Fall auf 1 gesetzt)

Nachfolgend wurde die Lage der Zellkerne in einem x,y-Koordinatensystem ausgegeben und gespeichert.

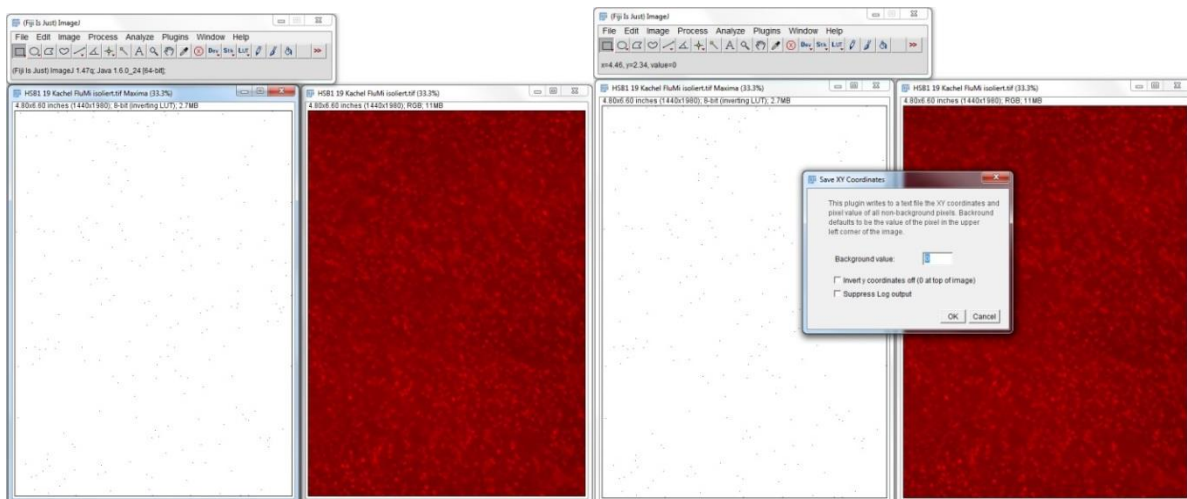


Abb. 29: Darstellung der Zellkerne in einem xy-Koordinatensystem

Anhand der zu jeder Kachel bekannten Bildgröße in Pixeln in „R“ und „SpatStat“ folgende Parameter errechnet:

Median der Nearest-Neighbor-Distance (MedNND):

Der Median der Abstände zur jeweils nächstgelegenen Nachbarzelle (NND = Nearest Neighbor Distance). Gemessen in Bildpunkten (Pixel).

Mittelwert der Nearest-Neighbor-Distance (MwNND):

Der Mittelwert der Abstände zur nächstgelegenen Nachbarzelle (in Pixel).

Absolute Zellzahl (AbsZZ):

Die absolute Anzahl der Zellkerne im analysierten Bereich.

Normierte Zellzahl (NormZZ):

Die absolute Zellzahl normiert und angepasst zu einer Standard-Kachel-Größe von 500x500 Bildpunkten (Pixel).

Clark-Evans-Index (CEI):

Der Clark-Evans-Aggregations-Index (CEI) [81] ist ein Maß zur Beurteilung der horizontalen Verteilungsmuster von Objekten, der bereits zuvor an Knorpelproben berechnet wurde [82]. Hierbei wird der berechnete mittlere Abstand zwischen einem Objekt und seinem nächstgelegenen Nachbarn (MwNND), in dieser Arbeit Knorpelzellen, mit dem mittleren aufgrund einer Zufallsverteilung zu erwartenden Abstand ins Verhältnis gesetzt. Als Referenz für die zu erwartende Zufälligkeit wird hierfür die Poisson-Verteilung (Diskrete Wahrscheinlichkeitsverteilung, nach Siméon Denis Poisson, franz. Mathematiker 1781-1840) verwendet.

Der in dieser Arbeit berechnete Koeffizient R des Clark-Evans-Indexes erfolgte hierbei in der Modifikation nach Donnelly, so dass eine Anpassung der angenommenen Verteilungen für alle vier rechtwinkligen Ecken jeder untersuchten Kachel besteht. Für einen Punkt nahe einer Ecke eines untersuchten Feldes würde die tatsächlich gemessene NND ohne die Donnelly Modifikation eher größer als statistisch wahrscheinlich ausgemessen werden [83].

Ergibt das Verhältnis der tatsächlichen Zellabstände und der zu erwartenden Zellabstände den Wert von genau oder nahe $R=1$ spricht dies für eine rein zufällige Verteilung der Knorpelzellen. Werte kleiner $R=1$ zeigen dagegen in zunehmendem Ausmaß die Tendenz zur Klumpung (Clusterung) an, wobei im extremsten Fall von $R=0$ alle Zellen an einem einzigen Punkt der Fläche zu finden wären. Zunehmende Werte größer $R=1$ zeigen umgekehrt eine immer größer werdende Tendenz zur regelmäßigen Verteilung an, wobei R seinen möglichen Maximalwert von $R=2,1491$ bei einem streng hexagonalen Verteilungsmuster annimmt [81,84].

Standard Deviance of Clark-Evans-Index (SDofCE):

Wert der Standard-Abweichung des Clark-Evans-Index R.

Pair Correlation Function (PCF):

Die Pair Correlation Function errechnet für jeden Abstand zwischen zwei Punkten (r) die Wahrscheinlichkeit dafür, dass jenes Punktepaar mit genau diesem Abstand vorkommt. Als Referenz dient hierbei wiederum die Poisson-Verteilung mit gleicher Intensität. Für $PCF=1$ gilt, dass der gemessene Abstand zwischen zwei Punkten (r) gleich der Wahrscheinlichkeit der zugehörigen Poisson-Verteilung ist, der Abstand (r) kommt also zufällig häufig vor.

Für Werte der PCF kleiner 1 gilt, dass der Abstand (r) seltener als in der Zufallsverteilung vorkommt, was auf eine größere Regelmäßigkeit, als im Poisson-Prozess hindeutet. Ist die PCF größer 1 kommt der Abstand (r) häufiger als in der Poisson-Verteilung vor, was für eine mit dem Wert zunehmende Clusterung (Klumpung) spricht.

Der Wert „PairColMax“ bezeichnet den Maximalwert der PCF.

Pair Correlation Funktion X-Maximum (PCF-Xmax oder xPairColMax):

Beschreibt, bei welchem Zell-Zell-Abstand der größte Wert der PCF auftritt. Gibt somit darüber Aufschluss über die räumliche Distanz zwischen den Zellen im Falle bestehender Klumpung

2.6.8 Statistische Auswertung

Zur statischen Auswertung wurde SigmaPlot 11 verwendet. Zur Korrelationsanalyse wurden der Pearson Product Moment Correlation Coefficient verwendet und Vielfelder-Tafeln angelegt. Zur Berechnung von signifikanten Unterschieden wurden ANOVA-on-Ranks-Tests und, so möglich, paarweise POST HOC-Tests durchgeführt.

Mit Microsoft Excel wurden zugehörige mathematischen Funktionen samt Bestimmtheitsmaß und Trendlinie dargestellt.

2.6.8.1 Lokale, Kachel-basierte Analyse

Nachdem alle oben beschriebenen Mess-Parameter entsprechend aufbereitet waren, wurde eine **lokale**, Kachel-basierte Analyse über alle Proben hinweg durchgeführt. Die Gesamtzahl aller Kacheln über alle 18 Proben hinweg betrug hierbei $n=781$. Der Wert der makroskopisch-visuellen Einteilung, welche per se nur Proben-bezogen über die ganze Probe hinweg vergeben wurde, wurde dabei entsprechend jeder Probe auf jede einzelne Kachel übertragen.

Es wurde eine **lokale**, Kachel-basierte Analyse in SigmaPlot 11 durchgeführt, in der jeder Parameter mit jedem anderen mittels des Pearson Product Moment Correlation-Tests auf Korrelation überprüft wurde.

Mit dem Pearson Product Moment Correlation -Test kann die Stärke des linearen Zusammenhangs von zwei Variablen berechnet werden. Der im Test errechnete Korrelationskoeffizient ist ein dimensionsloses Maß und kann Werte von -1 bis +1 annehmen, entsprechend einer negativ oder positiv gerichteten Abhängigkeit voneinander. Der p-Wert gibt die Stärke des positiven oder negativen Zusammenhangs an. Werte kleiner 0,05 zeigen dabei eine signifikante Abhängigkeit an [85]. Als statistisch signifikant wurden p-Werte von $p < 0,05$ eingestuft.

2.6.8.2 Globale, Proben-basierte Analyse

Zur **globalen**, Proben-basierten Analyse wurde zunächst für jede Probe die Mittelwerte der lokalen, Kachel-basierten Rohdaten für jeden Messparameter gebildet. Der globale REM-visuelle Wert und der Wert der makroskopisch-visuellen Einteilung waren per se gegeben. Mit diesen Mittelwerten wurde eine **globale**, Proben-basierte Korrelationsanalyse mittels des Pearson Product Moment Correlation-Tests in SigmaPlot 11 durchgeführt. Als statistisch signifikant wurden p-Werte von $p < 0,05$ eingestuft.

3. Ergebnisse

3.1 Makroskopisch-visuelle Einteilung der Schädigung des Knorpelgewebes

Als erstes wurde jeweils an allen aus dem OP erhaltenen Kondylen makroskopisch visuell der Grad des Knorpelschadens bestimmt (Makroskopisch-visuelle Einteilung). Da das Ausmaß des Knorpelschadens auf der medialen und lateralen Kondyle einer Probe auch bei isolierter Betrachtung naturgemäß nie gleich stark ausgeprägt war, wurden bei der Begutachtung entsprechende Areale anhand der obenstehenden Kriterien soweit mit dem bloßen Auge möglich definiert und anschließend als Probe aus dem entsprechenden Areal der Kondyle herausgelöst.

In Anlehnung an die Klassifikation von Knorpelschäden nach Outerbridge und die ICRS [68-70] ließen sich drei Schweregrade (glatt, aufgeraut, stark geschädigt) relativ gut, aber unscharf begrenzt definieren. Auch der stärkste Knorpelschaden, nämlich der komplette Verlust des Knorpels (Grad IV nach Outerbridge), konnte auf den Kondylen definiert werden, spielte für die weitere Analyse aber entsprechend keine Rolle, da hier naturgemäß kein Material gewonnen werden konnte. Diese Proben wurden ausgeschlossen. Bevor die einzelnen Proben gewonnen wurden, wurde spezifisch das Areal, aus dem die Proben gewonnen wurde, makroskopisch-visuell eingeteilt.

Probe-Nr.	Proben-Bezeichnung	Makroskopisch-visuelle Einteilung des Knorpelschadens
1	ADB1	2
2	ADC1	3
3	EHA1	1
4	EHB1	2
5	EHC1	3
6	ESA1	1
7	HSA1	1
8	HSB1	2
9	HSC1	3
10	LKA1	1
11	LKB1	2
12	LKC1	3
13	MRA1	1
14	MRB1	2
15	MRC1	3
16	UZA1	1
17	UZB1	2
18	UZC1	3

Tab. 6: Bezeichnung der Proben und jeweils gewählte makroskopisch-visuelle Einteilung des Knorpelschadens. Die Kürzel stellen zwei willkürlich gewählte Buchstabenkombinationen sowie den Schädigungsgrad (A bis C) sowie die Probenseriennummer dar.

Die folgende Abbildung zeigt, dass die 18 eingeschlossenen Proben in drei Gruppen zu je sechs Proben makroskopisch-visuell eingeteilt wurden und somit alle drei Schweregrade der Schädigung die gleiche Probenanzahl (sechs) beinhalteten.

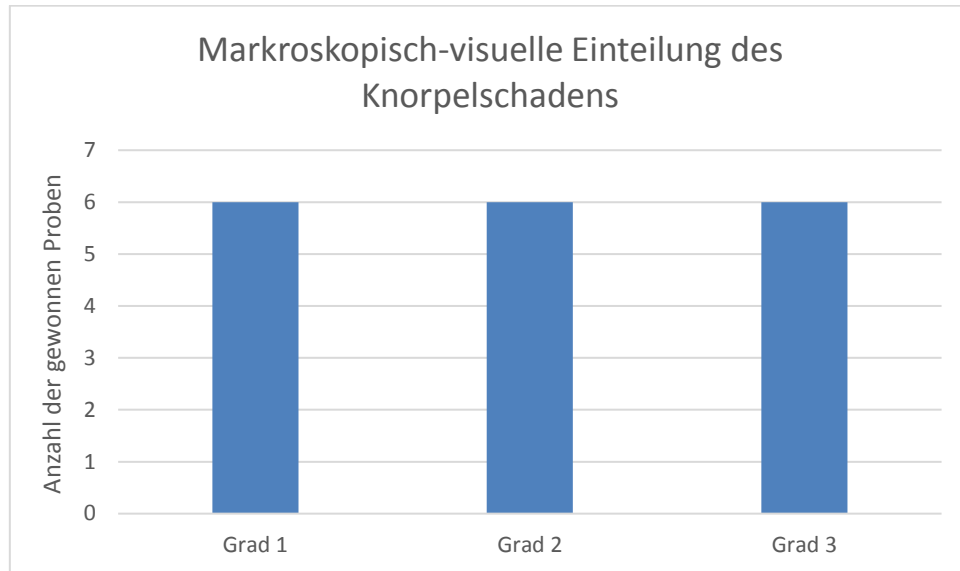


Abb. 30: Anzahl der gewonnenen Proben je Schädigungsgrad in der Makroskopisch-visuellen Einteilung des Knorpelschadens

3.2 Probenspezifische rasterelektronen- und fluoreszenzmikroskopische Darstellung und Klassifikation

Im Folgenden werden zunächst alle in dieser Arbeit analysierten REM-Aufnahmen sowie die Fluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen derselben Knorpelprobe abgebildet. Zusätzlich wird für jede Knorpelprobe der repräsentative, die gesamte Probe als Ganzes beschreibende Wert für die REM-visuelle, makroskopisch-visuelle und fluoreszenz-mikroskopisch-visuelle (= Grad der Organisation, „Pattern“) Klassifikation dargestellt.

Die Klassifikation der Organisation der oberflächlichen Knorpelzellen wird zur besseren Übersichtlichkeit im Folgenden noch einmal dargestellt: nach Fertigstellung der Rasterung jeder Probe konnten die einzelnen Kacheln jeder Probe ausgeschnitten und einzeln zunächst hinsichtlich der räumlichen Organisation der oberflächennahen Chondrozyten analysiert werden. Nach Rolaufts et al. [33,50] lassen sich je nach Schweregrad des Knorpelschadens typische räumliche Organisationsmuster (im Folgenden auch „Pattern“ genannt) der Chondrozyten differenzieren. Im eigenen Vorgehen wurden hierbei 5 verschiedene Schweregrade unterschieden, die Single Strings, Double Strings, Cluster sowie eine diffuse Anordnung ohne erkennbare Organisation sowie zellfreie Areale beinhalteten. Dies erfolgte analog zu [82], dargestellt in Tab. 7:

Stadium der Chondrozyten Organisation	Zugeordneter Wert
Single String	1
Double String	2
Clusters (small und big)	3
Diffuse Anordnung	4
Zellfreie Areale	5

Tab. 7: Zuordnung eines Wertes (Score) zu einem bestimmten Räumlichen Verteilungsmuster.

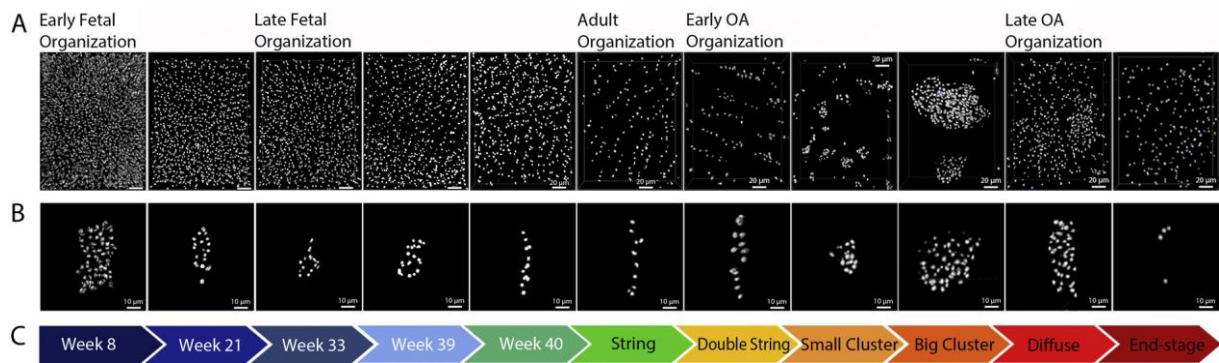


Abb. 31: Stadien der Chondrozyten-Organisation nach Felka [82]

Die Klassifikation der Organisation erfolgte, indem jede einzelne Kachel individuell betrachtet wurde. Die Zuordnung zum jeweiligen räumlichen Organisationsmuster erfolgte dabei zum in der Kachel überwiegenden Muster. Auf diese Weise wurden alle Kacheln einer Probe klassifiziert. Die Organisation der gesamten Probe wurde bestimmt, in dem alle Muster numerisch kodiert wurden (1: Strings; 2: Double Strings; 3: Cluster; 4: diffuse Verteilung; 5: zellfreie Areale) und der Durchschnittswert der Muster für jede individuelle Probe errechnet wurde. Darüber hinaus wurde der prozentuale Anteil eines jeden Musters einer Probe berechnet, indem z. B. der Anteil aller Kacheln mit Strings als prozentualer Anteil aller Kacheln einer Probe errechnet wurde.

Im Folgenden werden nun alle Proben individuell abgebildet sowie ihre zugehörigen globalen Klassifikationsergebnisse (Scores) dargestellt.

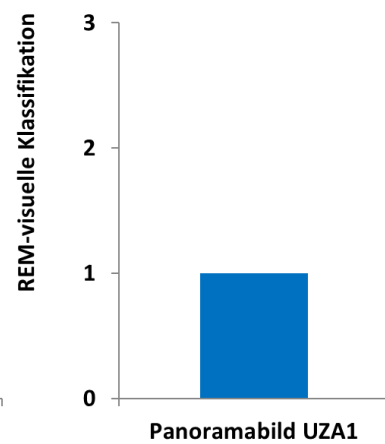
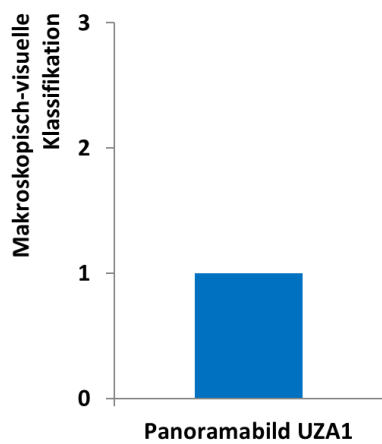
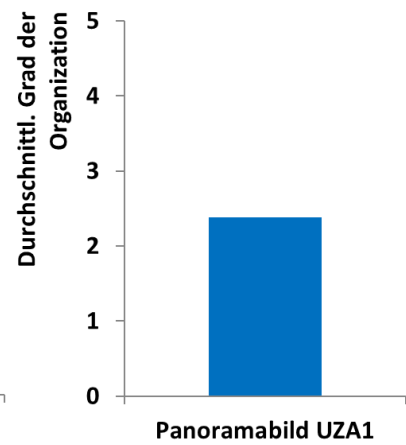
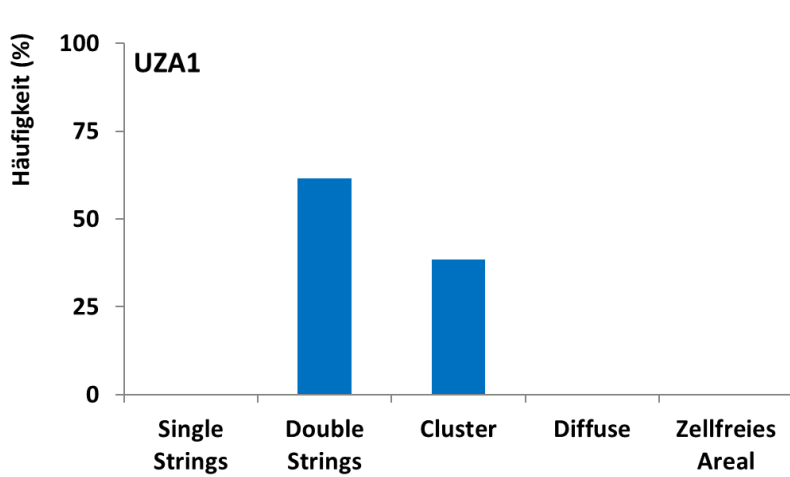
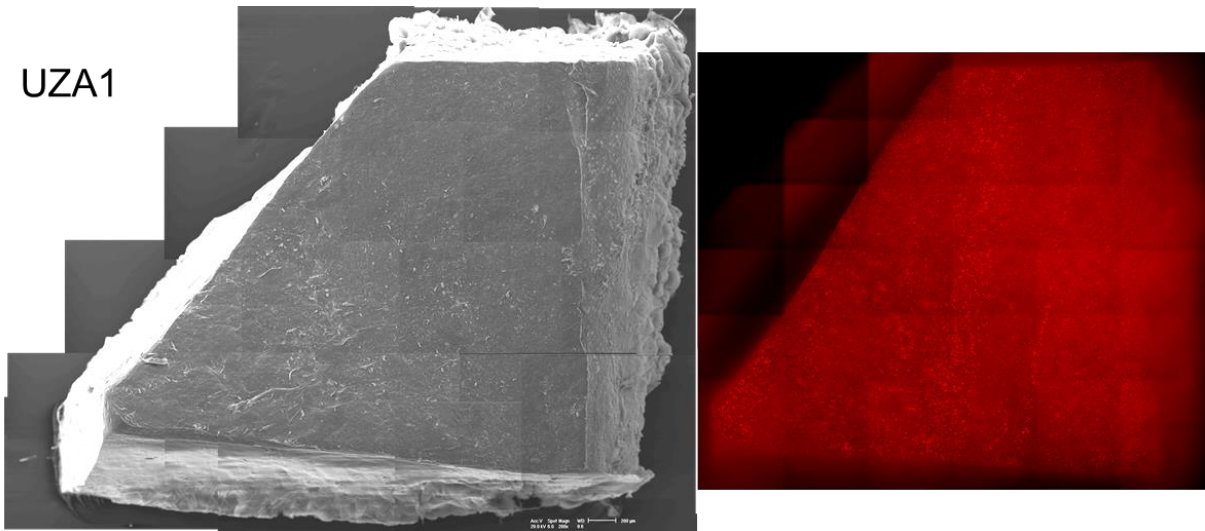


Abb. 32: Rasterelektronenmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe UZA1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen.

Diese Abbildung zeigt im oberen Anteil links das elektronen-mikroskopische und rechts das fluoreszenz-mikroskopische Bild der-selben Probe in den gewählten

Größenverhältnissen. In der Mitte findet sich links die lokale, kachel-basierte Häufigkeit der Organisationsmuster für jede einzelne Kachel, dargestellt als Prozentsatz aller in der Fluoreszenzmikroskopie gescorten Kacheln, rechts daneben der errechnete Durchschnittswert der Organisation für die gesamte Probe. Unten in der Abbildung zeigt sich links der zugehörige makroskopisch-visuelle Score und rechts der zugehörige globale REM-visuelle Score der gesamten Probe.

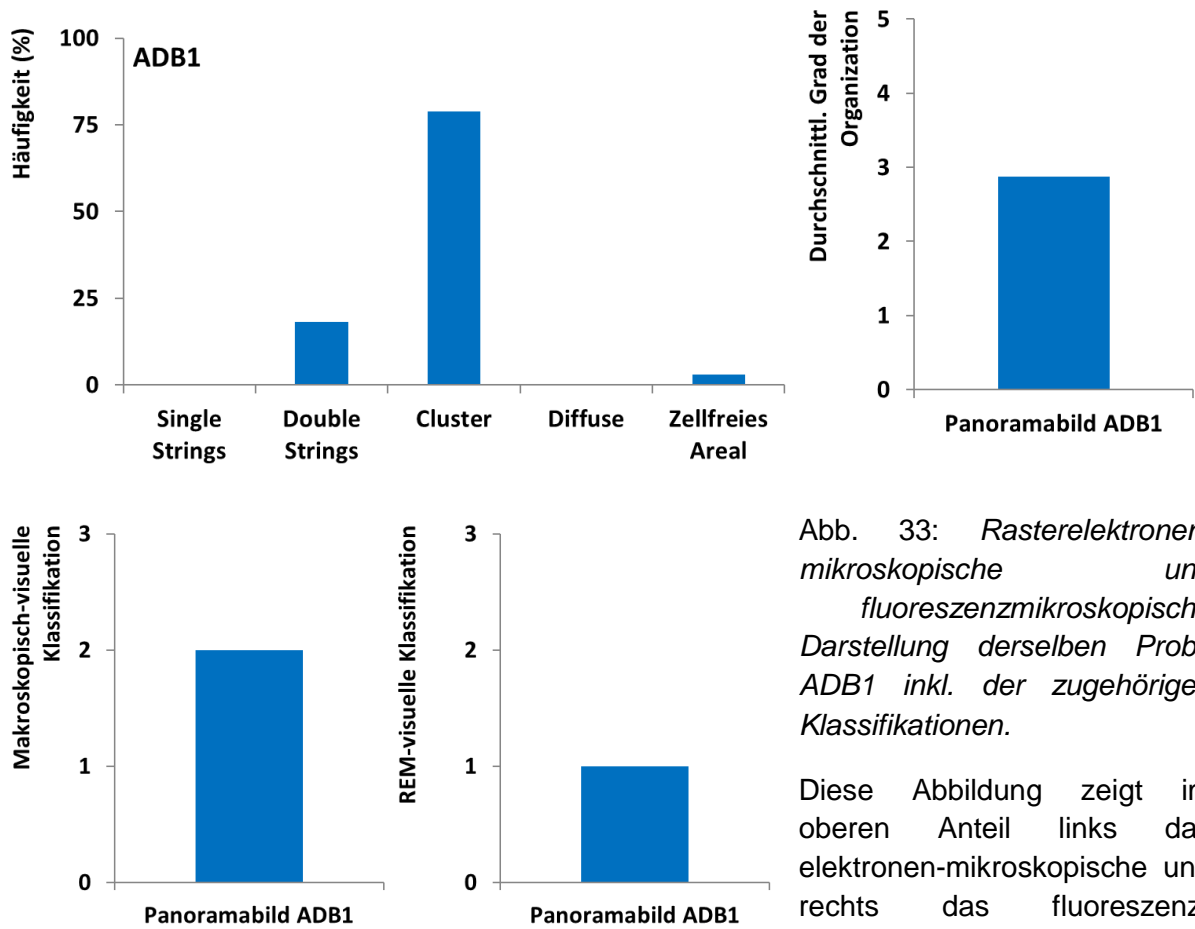
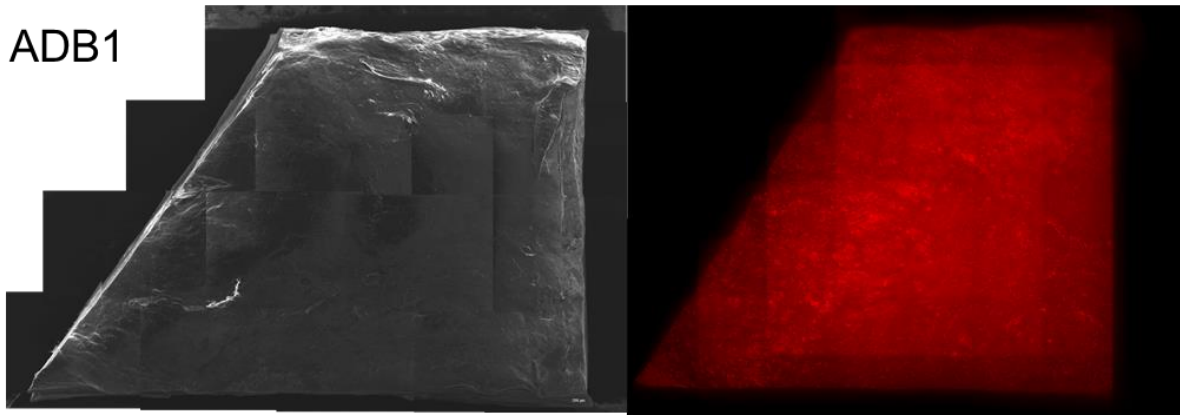


Abb. 33: Rasterelektronenmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe ADB1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen.

Diese Abbildung zeigt im oberen Anteil links das elektronen-mikroskopische und rechts das fluoreszenz-mikroskopische Bild der-selben

Probe in den gewählten Größenverhältnissen. In der Mitte findet sich links die lokale, kachel-basierte Häufigkeit der Organisationsmuster für jede einzelne Kachel, dargestellt als Prozentsatz aller in der Fluoreszenzmikroskopie gescorten Kacheln, rechts daneben der errechnete Durchschnittswert der Organization für die gesamte Probe. Unten in der Abbildung zeigt sich links der zugehörige makroskopisch-visuelle Score und rechts der zugehörige globale REM-visuelle Score der gesamten Probe.

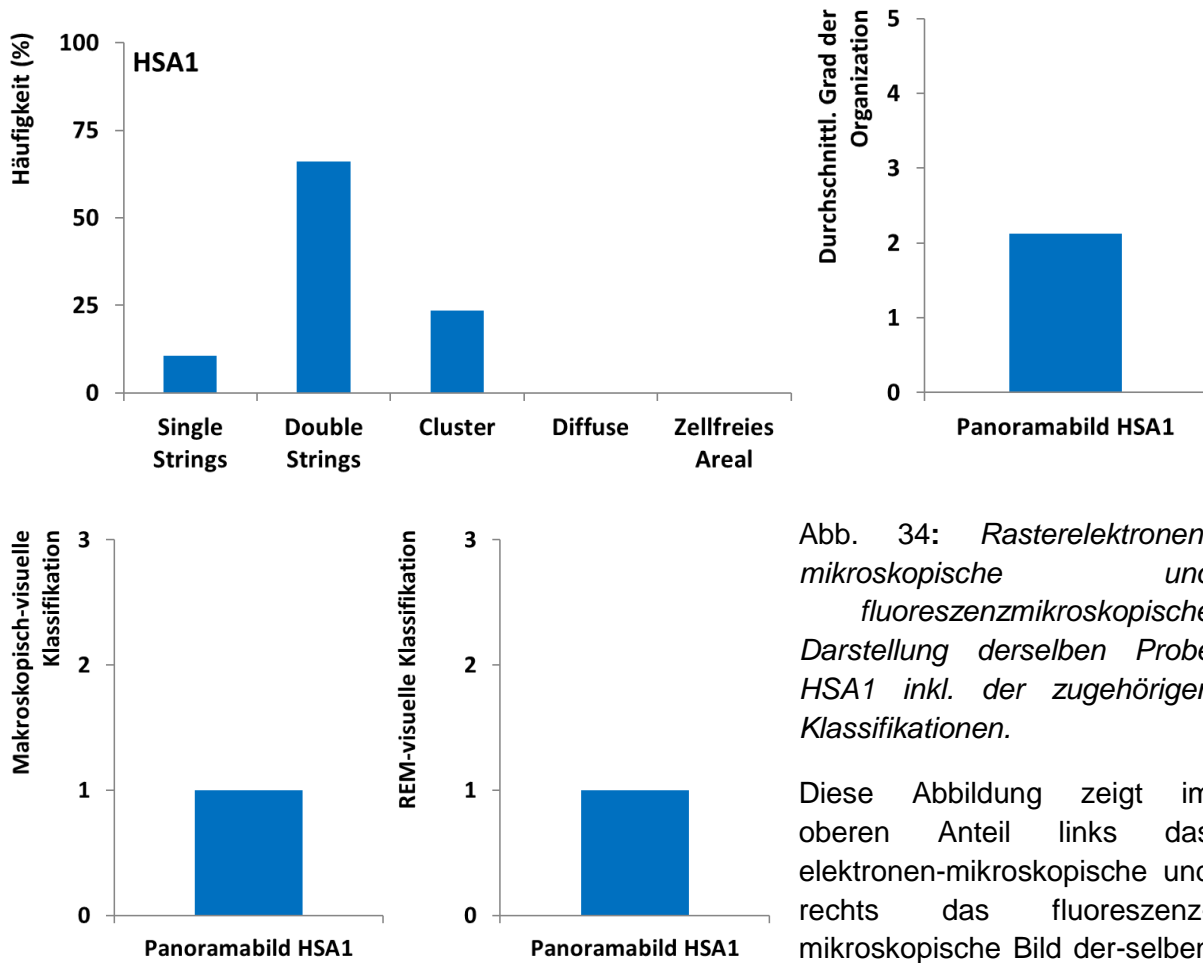
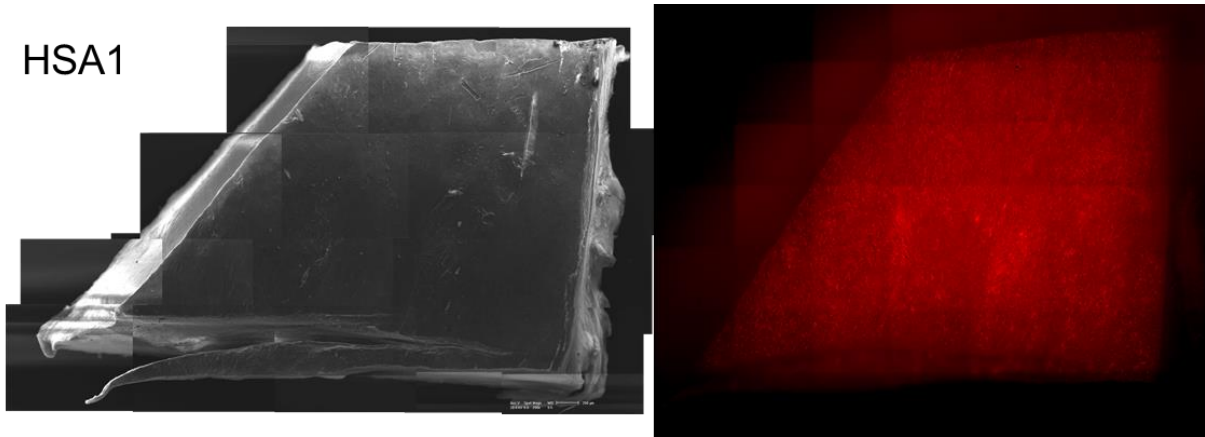


Abb. 34: Rasterelektronenmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe HSA1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen.

Diese Abbildung zeigt im oberen Anteil links das elektronen-mikroskopische und rechts das fluoreszenz-mikroskopische Bild der-selben Probe in den gewählten

Größenverhältnissen. In der Mitte findet sich links die lokale, kachel-basierte Häufigkeit der Organisationsmuster für jede einzelne Kachel, dargestellt als Prozentsatz aller in der Fluoreszenzmikroskopie gescorten Kacheln, rechts daneben der errechnete Durchschnittswert der Organization für die gesamte Probe. Unten in der Abbildung zeigt sich links der zugehörige makroskopisch-visuelle Score und rechts der zugehörige globale REM-visuelle Score der gesamten Probe.

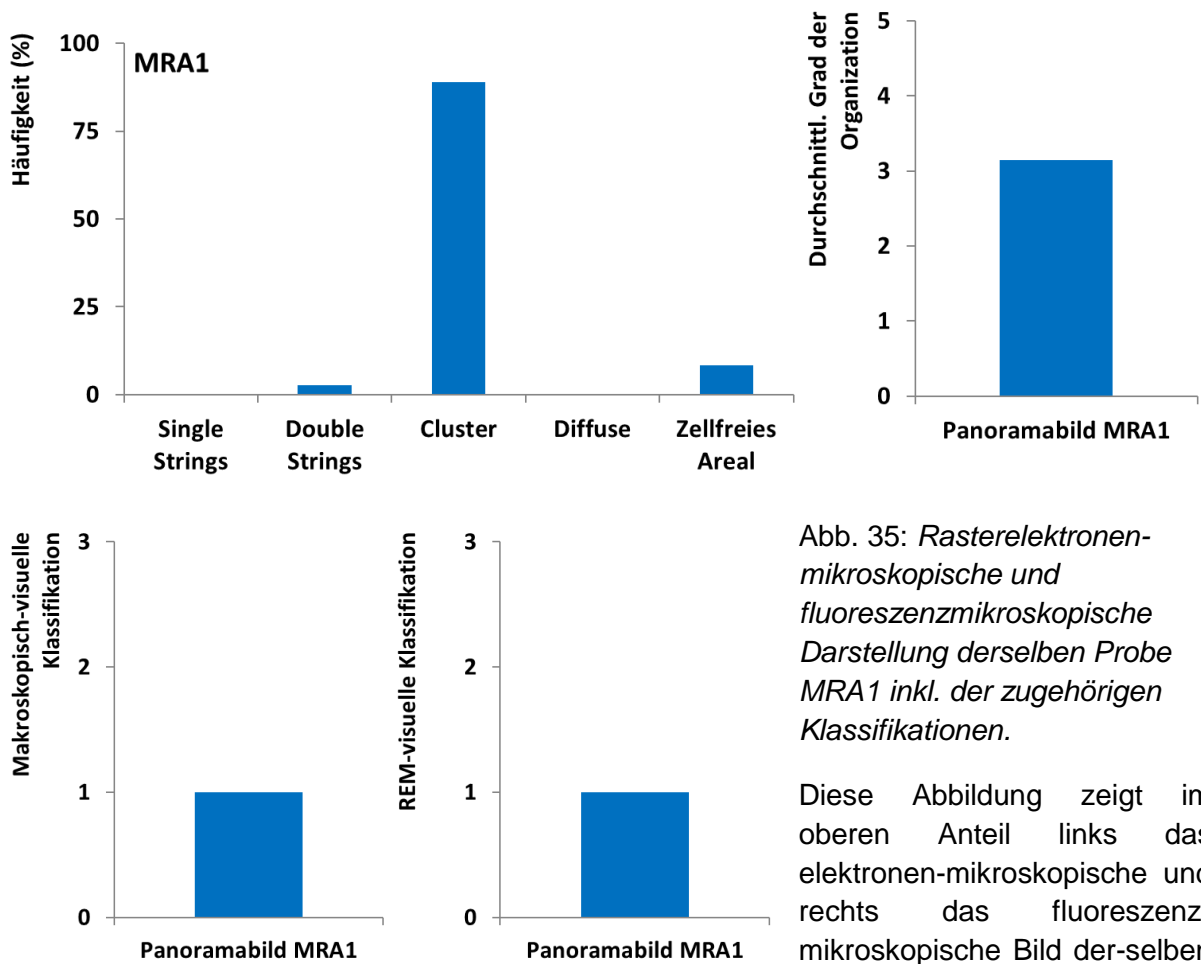
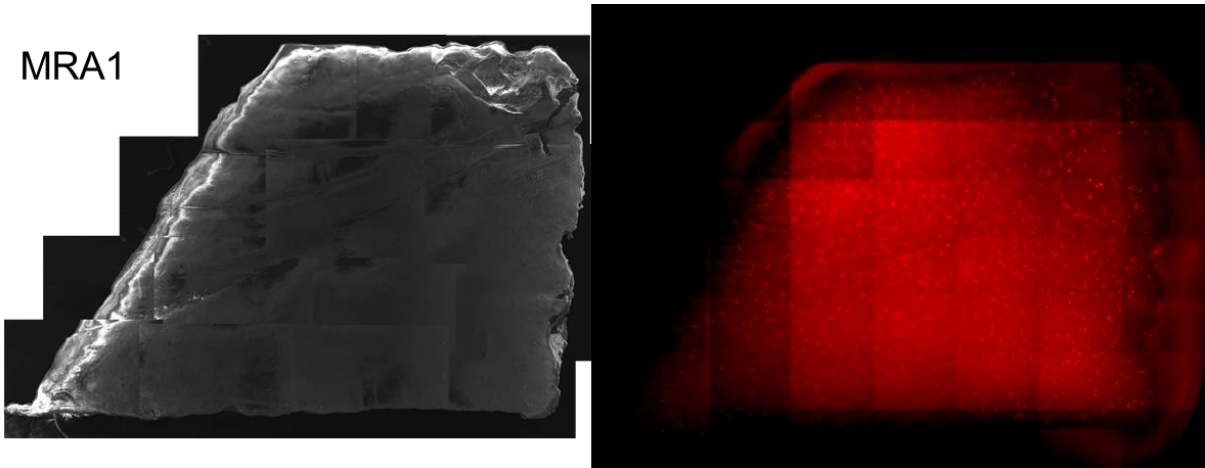


Abb. 35: Rasterelektronenmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe MRA1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen.

Diese Abbildung zeigt im oberen Anteil links das elektronen-mikroskopische und rechts das fluoreszenz-mikroskopische Bild der-selben Probe in den gewählten

Größenverhältnissen. In der Mitte findet sich links die lokale, kachel-basierte Häufigkeit der Organisationsmuster für jede einzelne Kachel, dargestellt als Prozentsatz aller in der Fluoreszenzmikroskopie gescorten Kacheln, rechts daneben der errechnete Durchschnittswert der Organisation für die gesamte Probe. Unten in der Abbildung zeigt sich links der zugehörige makroskopisch-visuelle Score und rechts der zugehörige globale REM-visuelle Score der gesamten Probe.

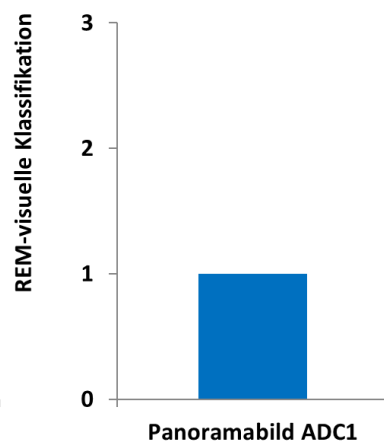
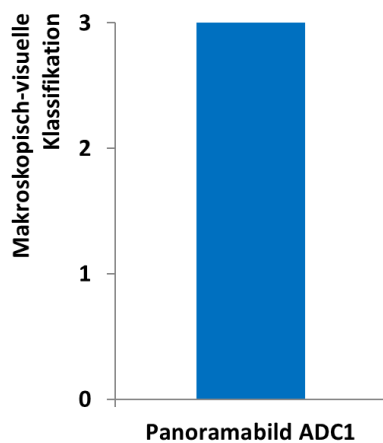
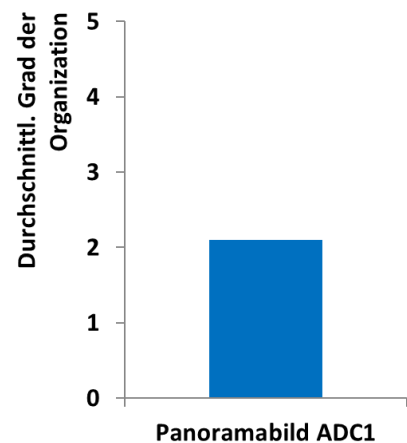
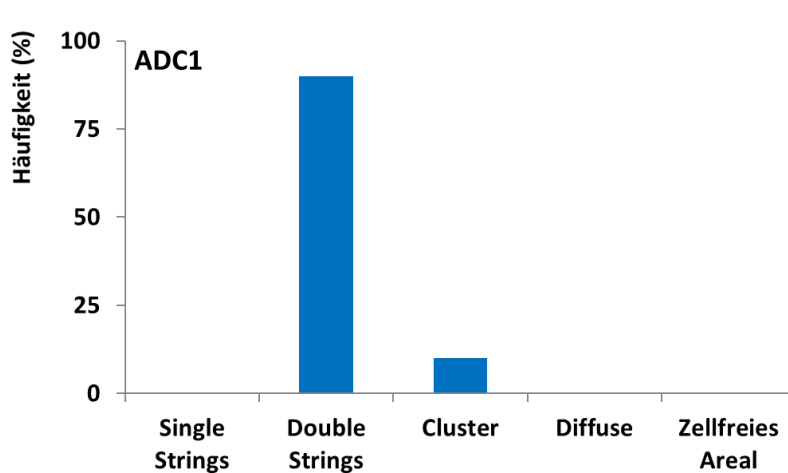
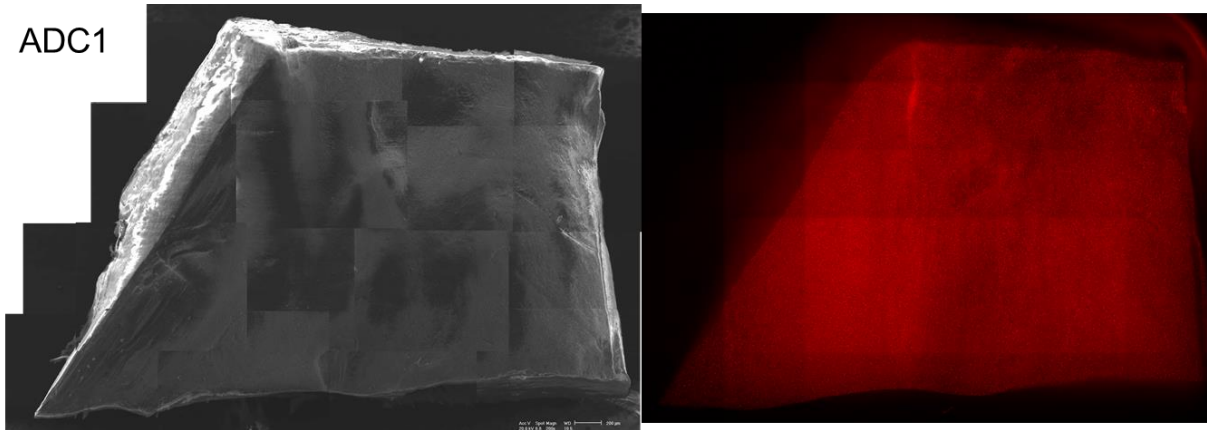


Abb. 36: Rasterelektronenmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe ADC1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen.

Diese Abbildung zeigt im oberen Anteil links das elektronen-mikroskopische und rechts das fluoreszenz-mikroskopische Bild der-selben Probe in den gewählten

Größenverhältnissen. In der Mitte findet sich links die lokale, kachel-basierte Häufigkeit der Organisationsmuster für jede einzelne Kachel, dargestellt als Prozentsatz aller in der Fluoreszenzmikroskopie gescorten Kacheln, rechts daneben der errechnete Durchschnittswert der Organisation für die gesamte Probe. Unten in der Abbildung zeigt sich links der zugehörige makroskopisch-visuelle Score und rechts der zugehörige globale REM-visuelle Score der gesamten Probe.

HSB1

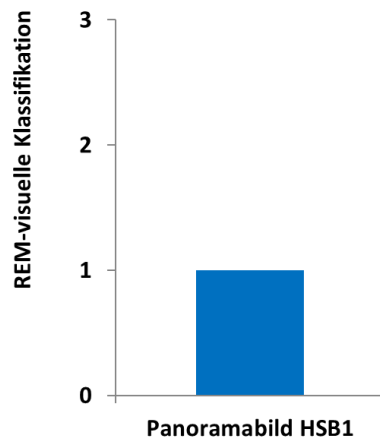
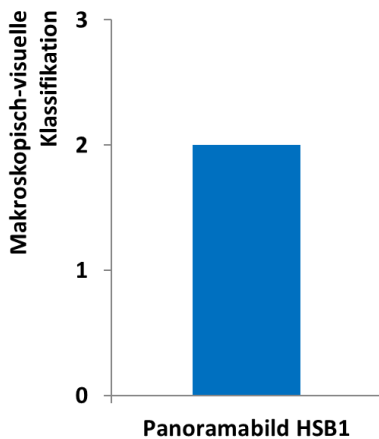
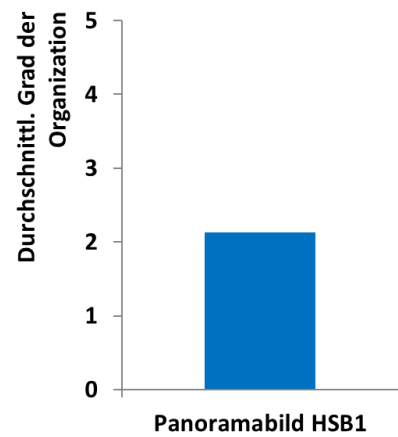
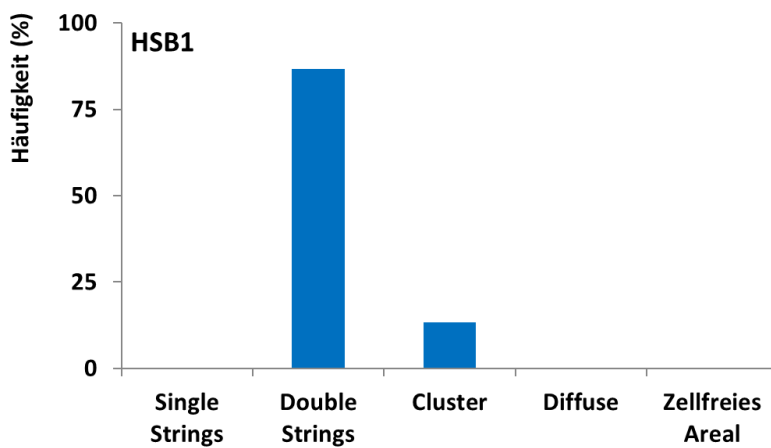
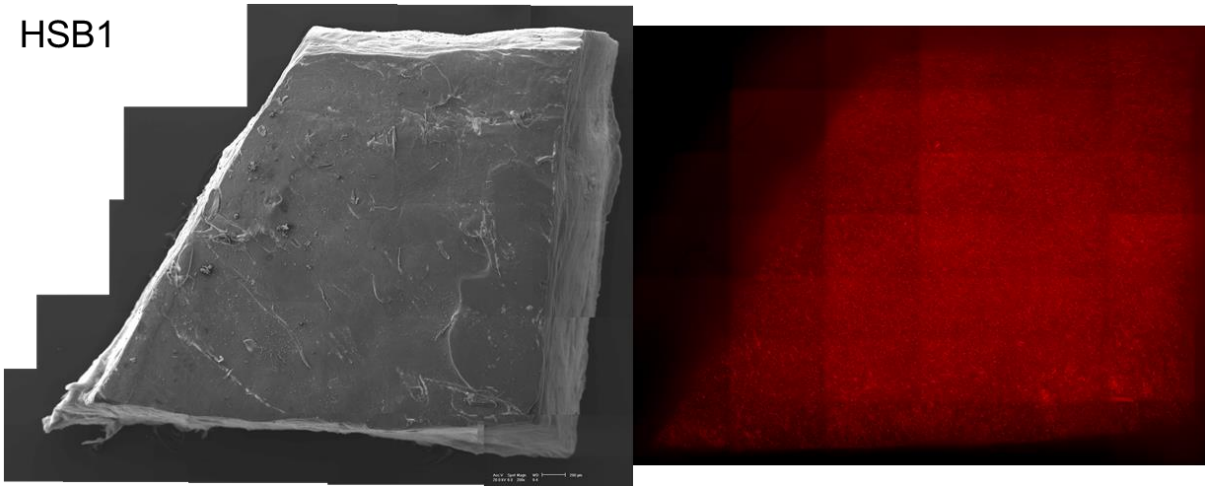


Abb. 37: Rasterelektronenmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe HSB1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen.

Diese Abbildung zeigt im oberen Anteil links das elektronen-mikroskopische und rechts das fluoreszenz-mikroskopische Bild der-selben Probe in den gewählten

Größenverhältnissen. In der Mitte findet sich links die lokale, kachel-basierte Häufigkeit der Organisationsmuster für jede einzelne Kachel, dargestellt als Prozentsatz aller in der Fluoreszenzmikroskopie gescorten Kacheln, rechts daneben der errechnete Durchschnittswert der Organisation für die gesamte Probe. Unten in der Abbildung zeigt sich links der zugehörige makroskopisch-visuelle Score und rechts der zugehörige globale REM-visuelle Score der gesamten Probe.

EHA1

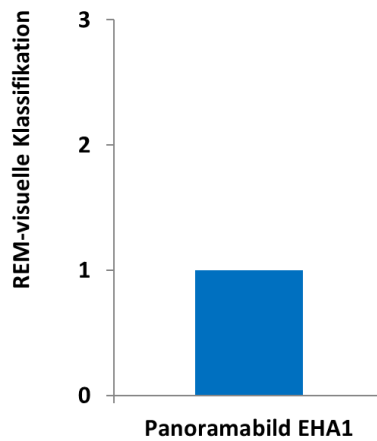
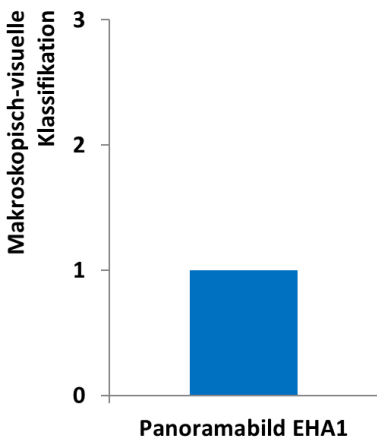
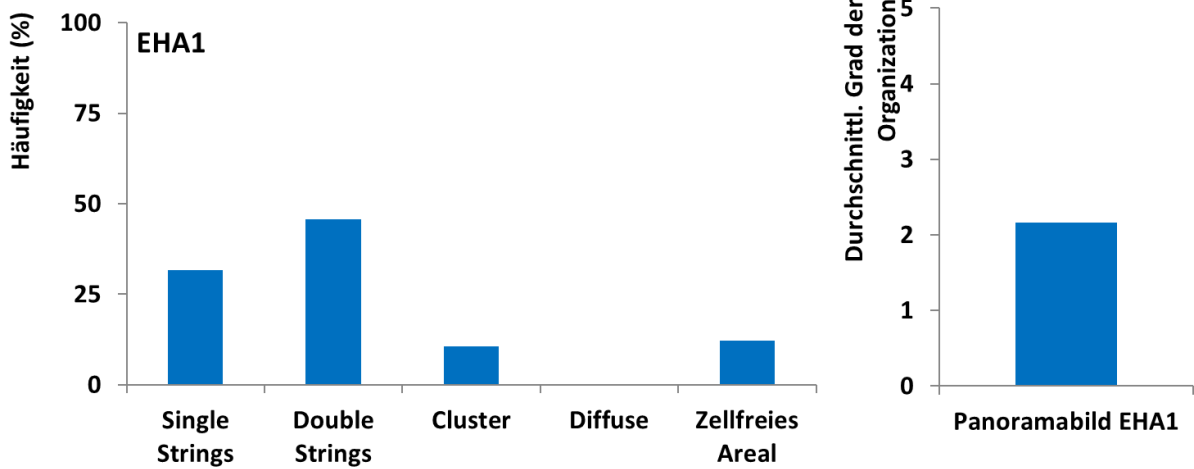
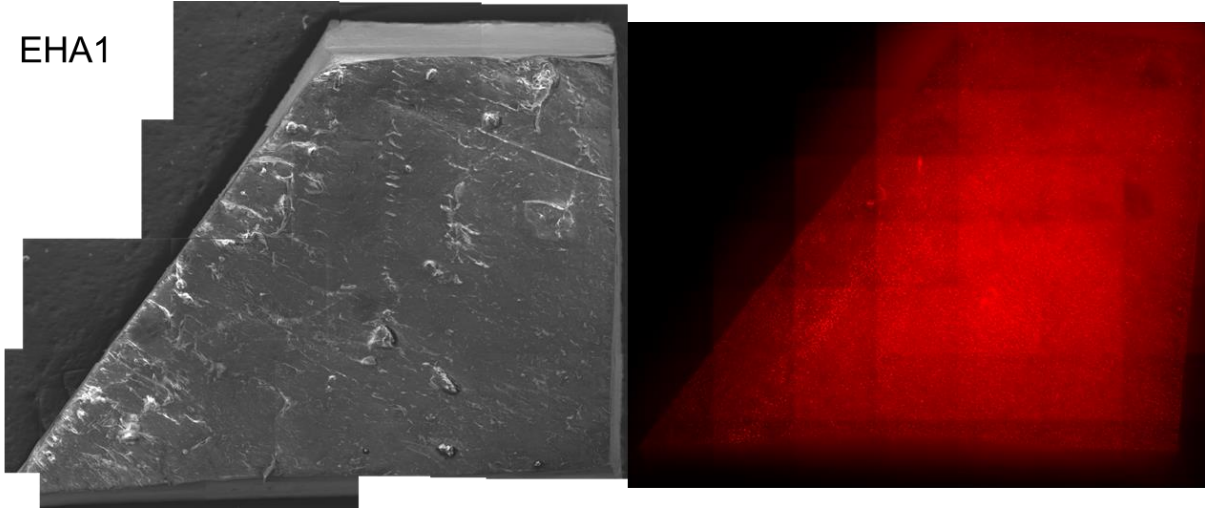


Abb. 38: Rasterelektronenmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe EHA1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen.

Diese Abbildung zeigt im oberen Anteil links das elektronenmikroskopische und rechts das fluoreszenzmikroskopische Bild der-selben Probe in den gewählten

Größenverhältnissen. In der Mitte findet sich links die lokale, kachel-basierte Häufigkeit der Organisationsmuster für jede einzelne Kachel, dargestellt als Prozentsatz aller in der Fluoreszenzmikroskopie gescorten Kacheln, rechts daneben der errechnete Durchschnittswert der Organization für die gesamte Probe. Unten in der Abbildung zeigt sich links der zugehörige makroskopisch-visuelle Score und rechts der zugehörige globale REM-visuelle Score der gesamten Probe.

ESA1

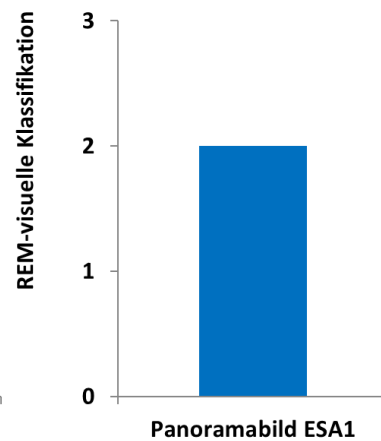
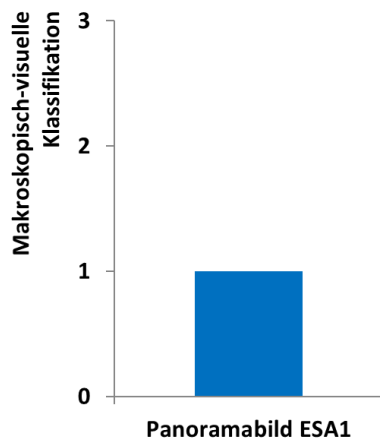
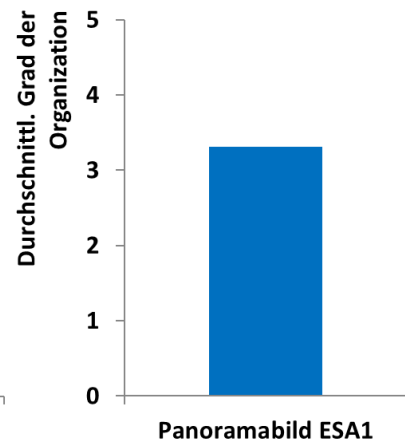
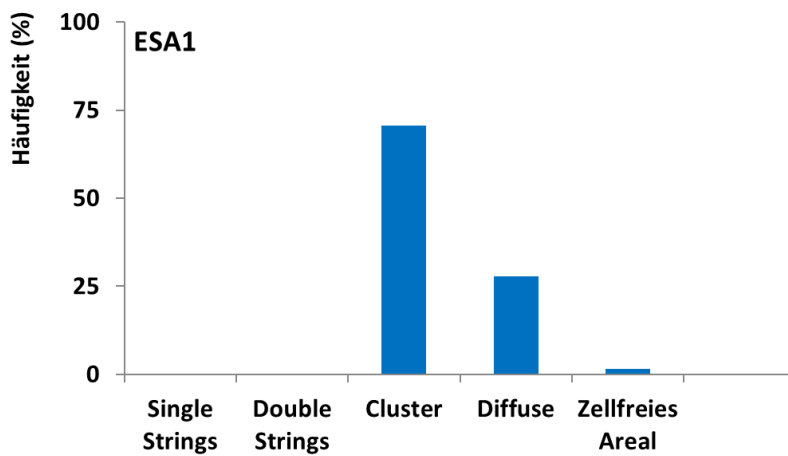
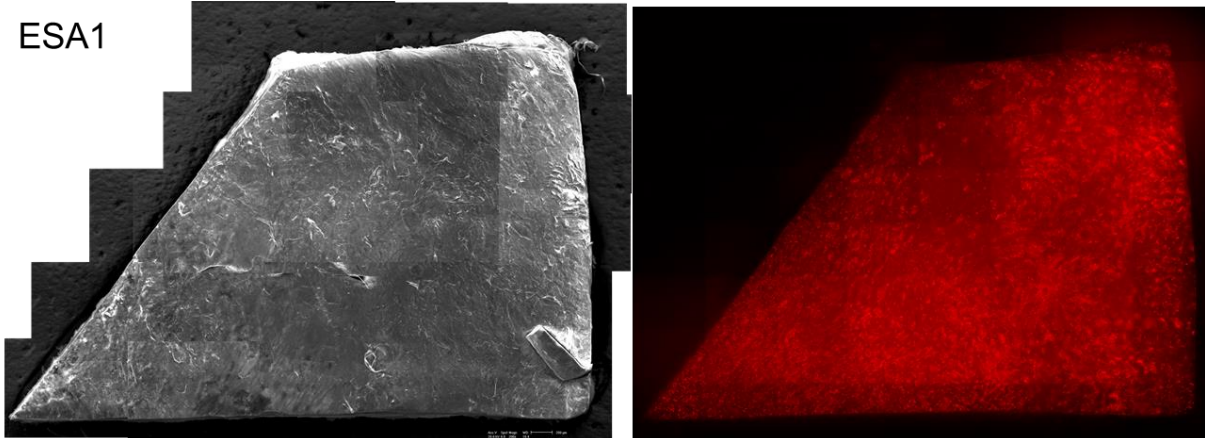


Abb. 39: Rasterelektronenmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe ESA1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen.

Diese Abbildung zeigt im oberen Anteil links das elektronen-mikroskopische und rechts das fluoreszenz-mikroskopische Bild der-selben Probe in den gewählten

Größenverhältnissen. In der Mitte findet sich links die lokale, kachel-basierte Häufigkeit der Organisationsmuster für jede einzelne Kachel, dargestellt als Prozentsatz aller in der Fluoreszenzmikroskopie gescorten Kacheln, rechts daneben der errechnete Durchschnittswert der Organisation für die gesamte Probe. Unten in der Abbildung zeigt sich links der zugehörige makroskopisch-visuelle Score und rechts der zugehörige globale REM-visuelle Score der gesamten Probe.

LKA1

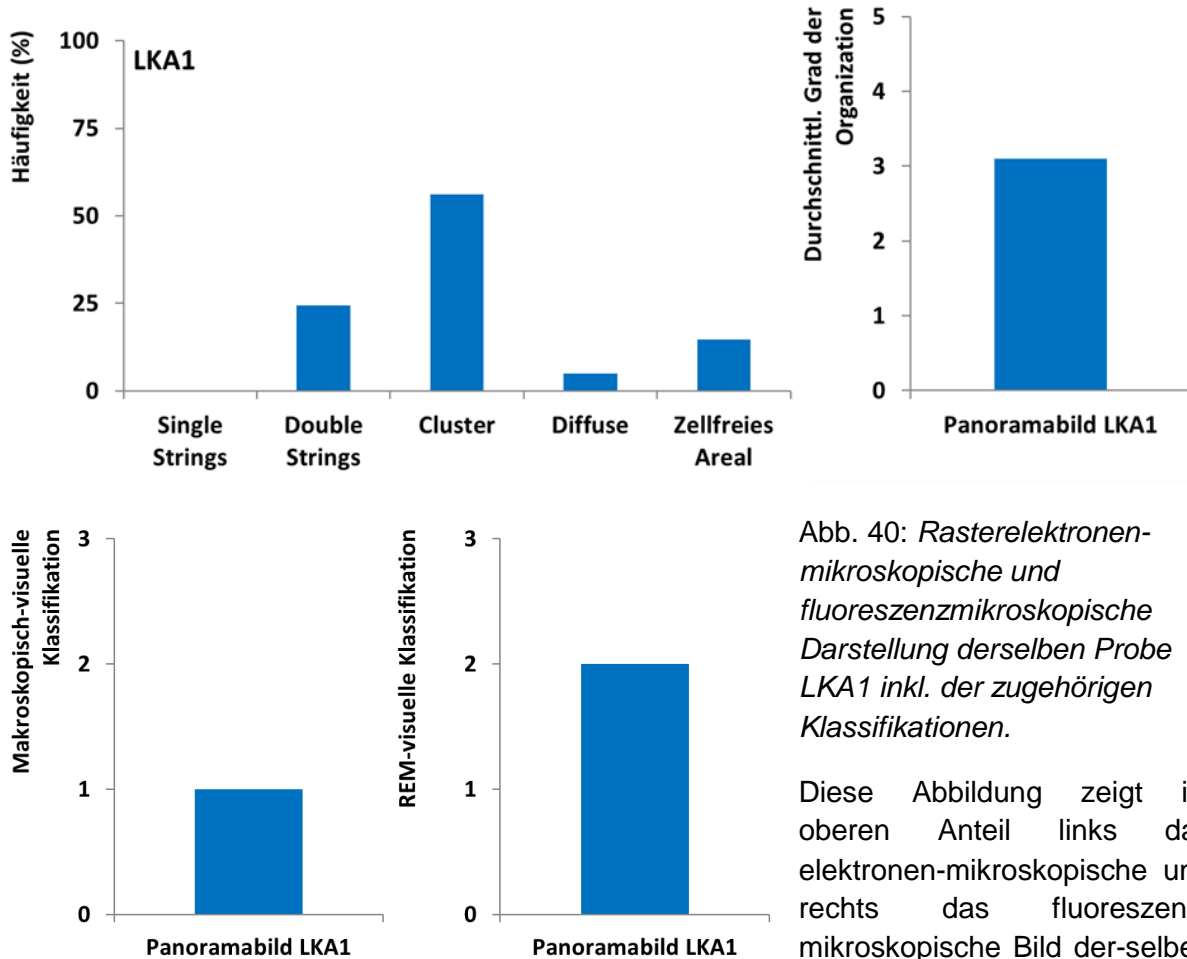
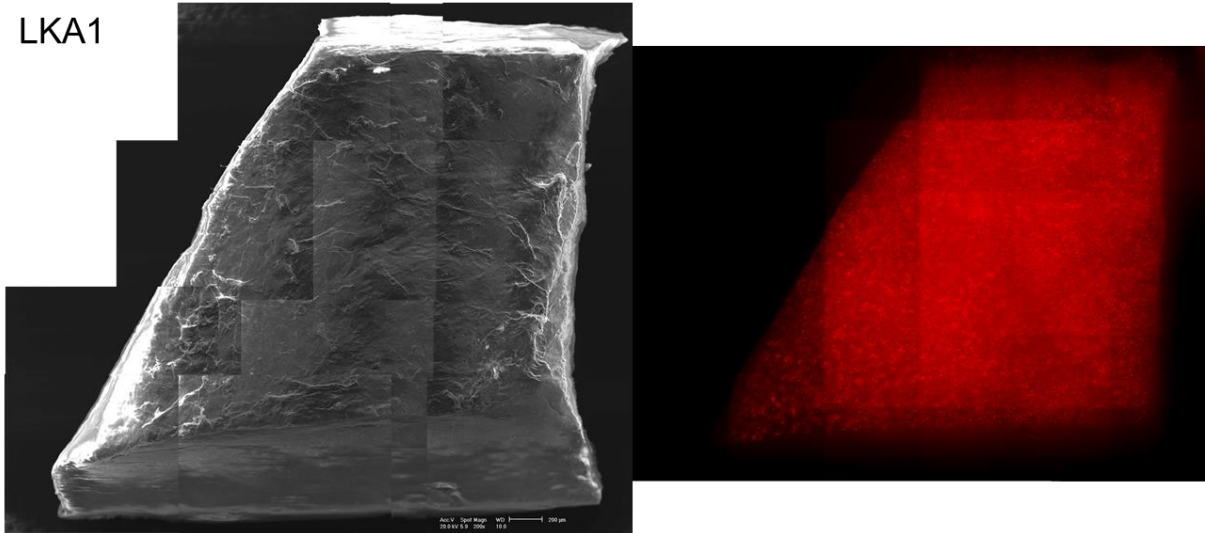


Abb. 40: Rasterelektronenmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe LKA1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen.

Diese Abbildung zeigt im oberen Anteil links das elektronen-mikroskopische und rechts das fluoreszenz-mikroskopische Bild der-selben Probe in den gewählten

Größenverhältnissen. In der Mitte findet sich links die lokale, kachel-basierte Häufigkeit der Organisationsmuster für jede einzelne Kachel, dargestellt als Prozentsatz aller in der Fluoreszenzmikroskopie gescorten Kacheln, rechts daneben der errechnete Durchschnittswert der Organisation für die gesamte Probe. Unten in der Abbildung zeigt sich links der zugehörige makroskopisch-visuelle Score und rechts der zugehörige globale REM-visuelle Score der gesamten Probe.

HSC1

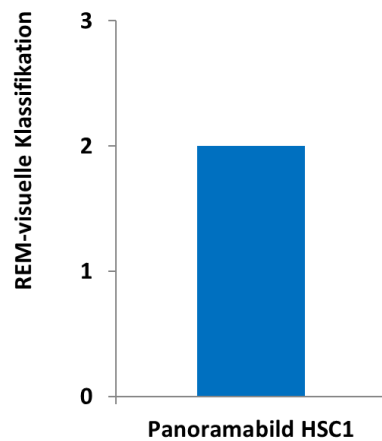
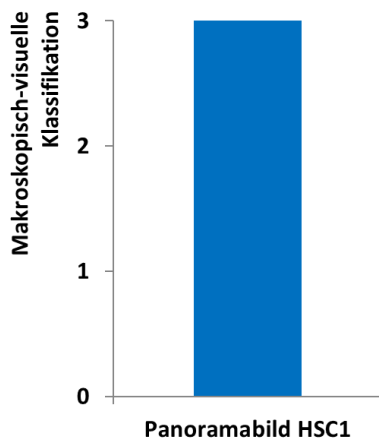
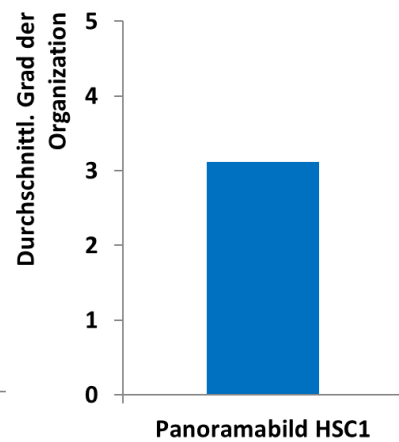
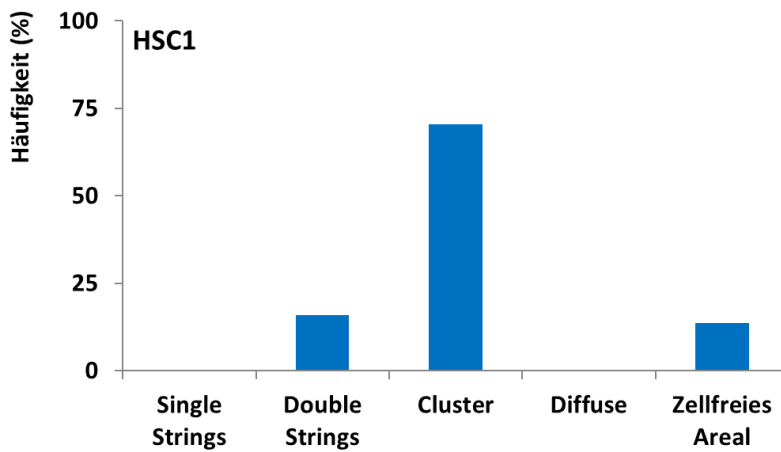
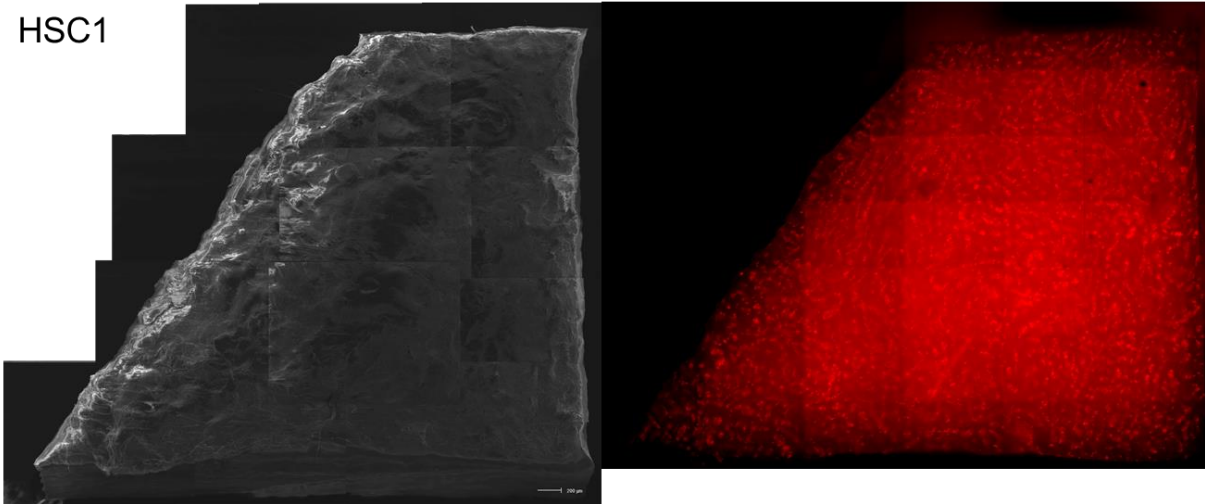


Abb 41: Rasterelektronenmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe HSC1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen.

Diese Abbildung zeigt im oberen Anteil links das elektronen-mikroskopische und rechts das fluoreszenz-mikroskopische Bild der-selben Probe in den gewählten

Größenverhältnissen. In der Mitte findet sich links die lokale, kachel-basierte Häufigkeit der Organisationsmuster für jede einzelne Kachel, dargestellt als Prozentsatz aller in der Fluoreszenzmikroskopie gescorten Kacheln, rechts daneben der errechnete Durchschnittswert der Organisation für die gesamte Probe. Unten in der Abbildung zeigt sich links der zugehörige makroskopisch-visuelle Score und rechts der zugehörige globale REM-visuelle Score der gesamten Probe.

UZB1

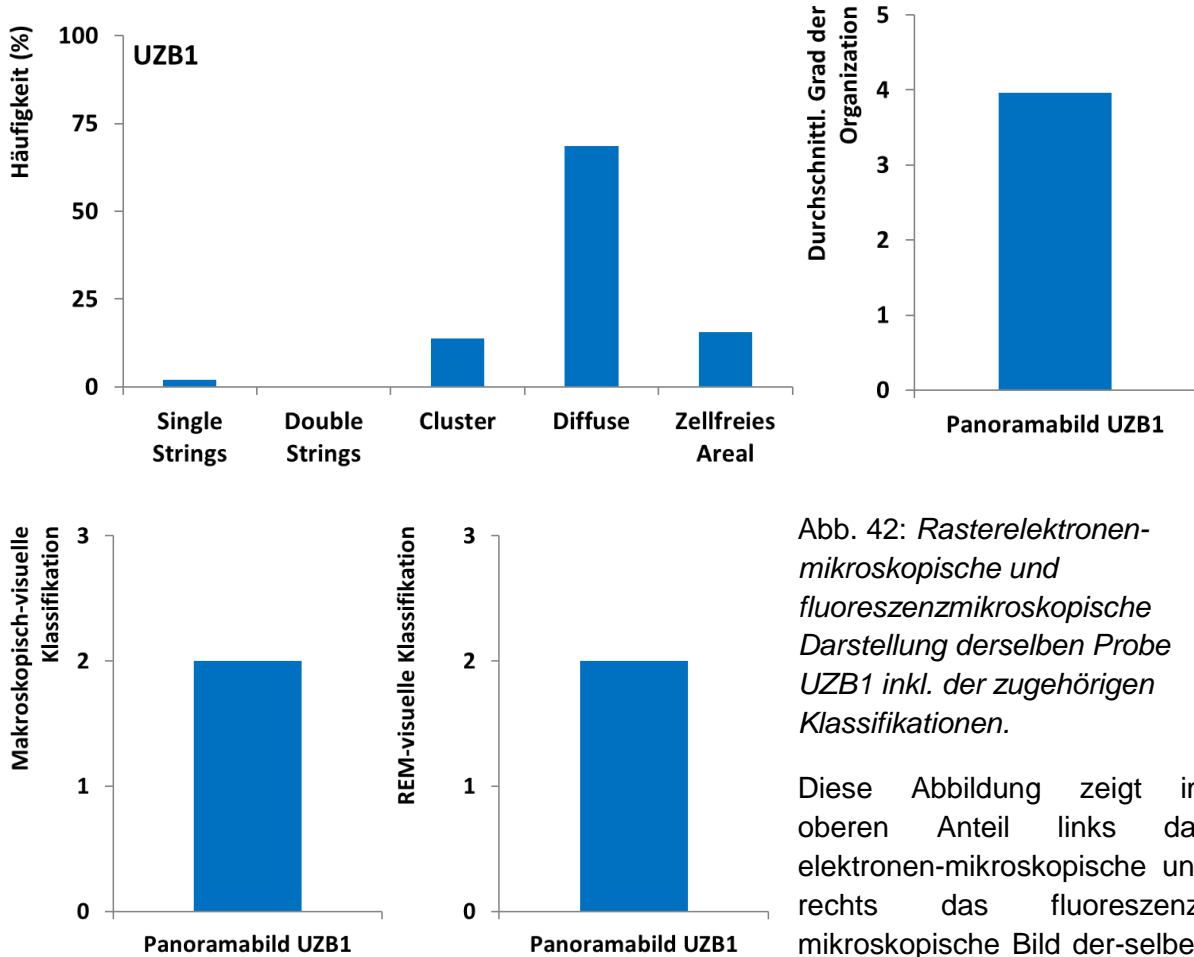
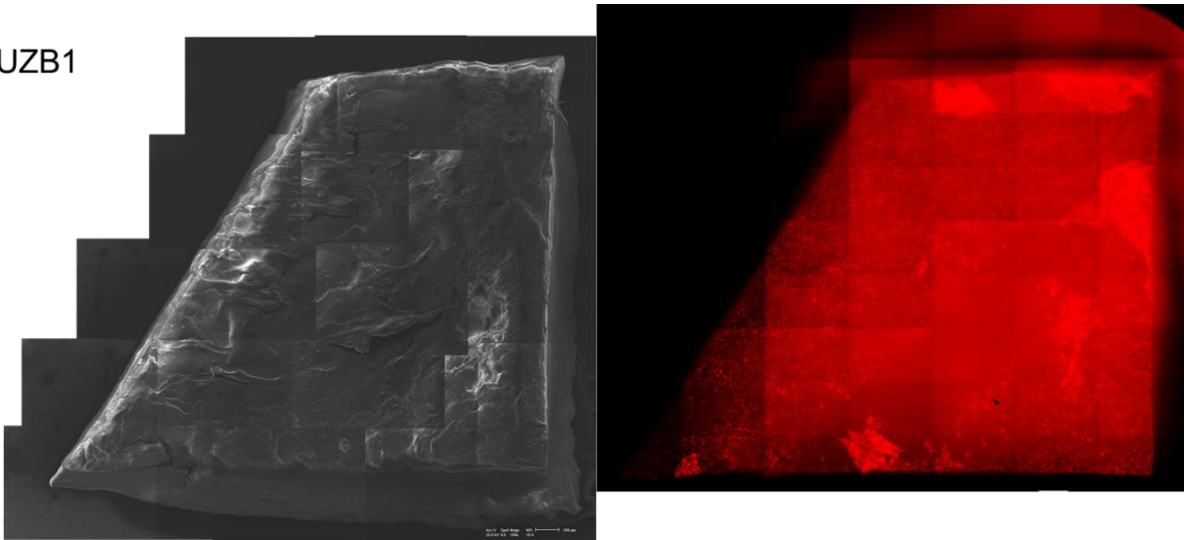


Abb. 42: Rasterelektronenmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe UZB1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen.

Diese Abbildung zeigt im oberen Anteil links das elektronenmikroskopische und rechts das fluoreszenzmikroskopische Bild der-selben Probe in den gewählten

Größenverhältnissen. In der Mitte findet sich links die lokale, kachel-basierte Häufigkeit der Organisationsmuster für jede einzelne Kachel, dargestellt als Prozentsatz aller in der Fluoreszenzmikroskopie gescorten Kacheln, rechts daneben der errechnete Durchschnittswert der Organization für die gesamte Probe. Unten in der Abbildung zeigt sich links der zugehörige makroskopisch-visuelle Score und rechts der zugehörige globale REM-visuelle Score der gesamten Probe.

LKB1

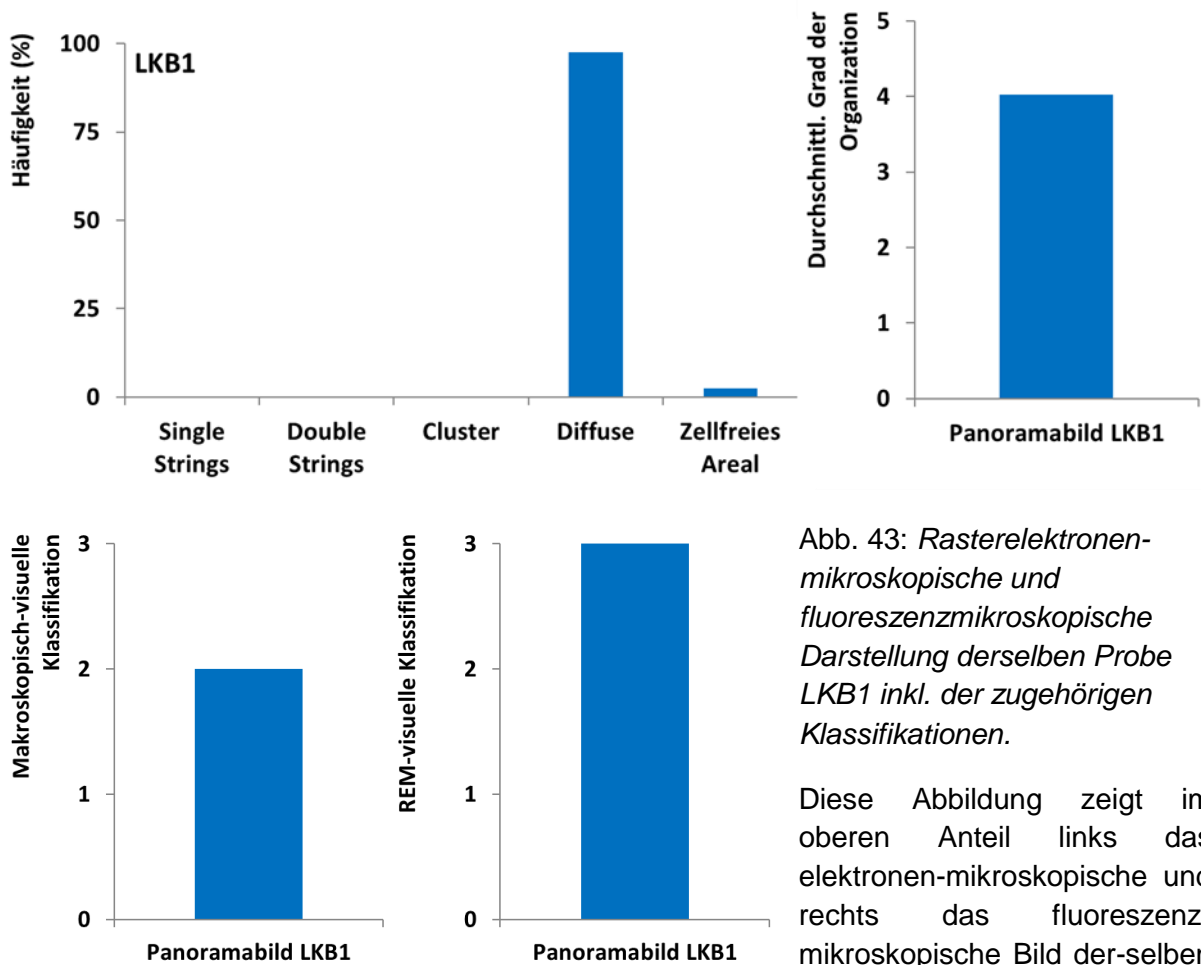
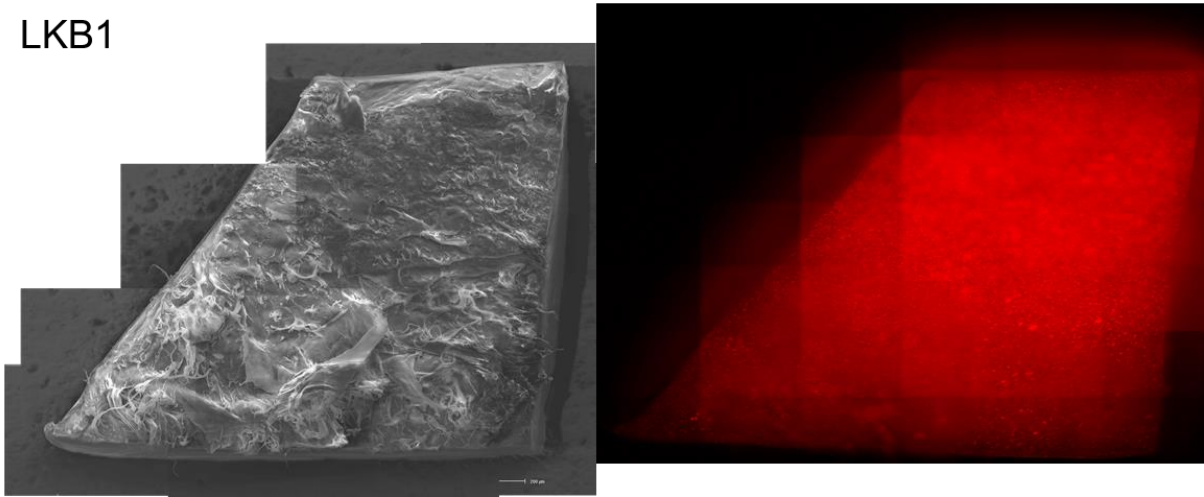


Abb. 43: Rasterelektronenmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe LKB1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen.

Diese Abbildung zeigt im oberen Anteil links das elektronen-mikroskopische und rechts das fluoreszenz-mikroskopische Bild der-selben Probe in den gewählten

Größenverhältnissen. In der Mitte findet sich links die lokale, kachel-basierte Häufigkeit der Organisationsmuster für jede einzelne Kachel, dargestellt als Prozentsatz aller in der Fluoreszenzmikroskopie gescorten Kacheln, rechts daneben der errechnete Durchschnittswert der Organisation für die gesamte Probe. Unten in der Abbildung zeigt sich links der zugehörige makroskopisch-visuelle Score und rechts der zugehörige globale REM-visuelle Score der gesamten Probe.

MRB1

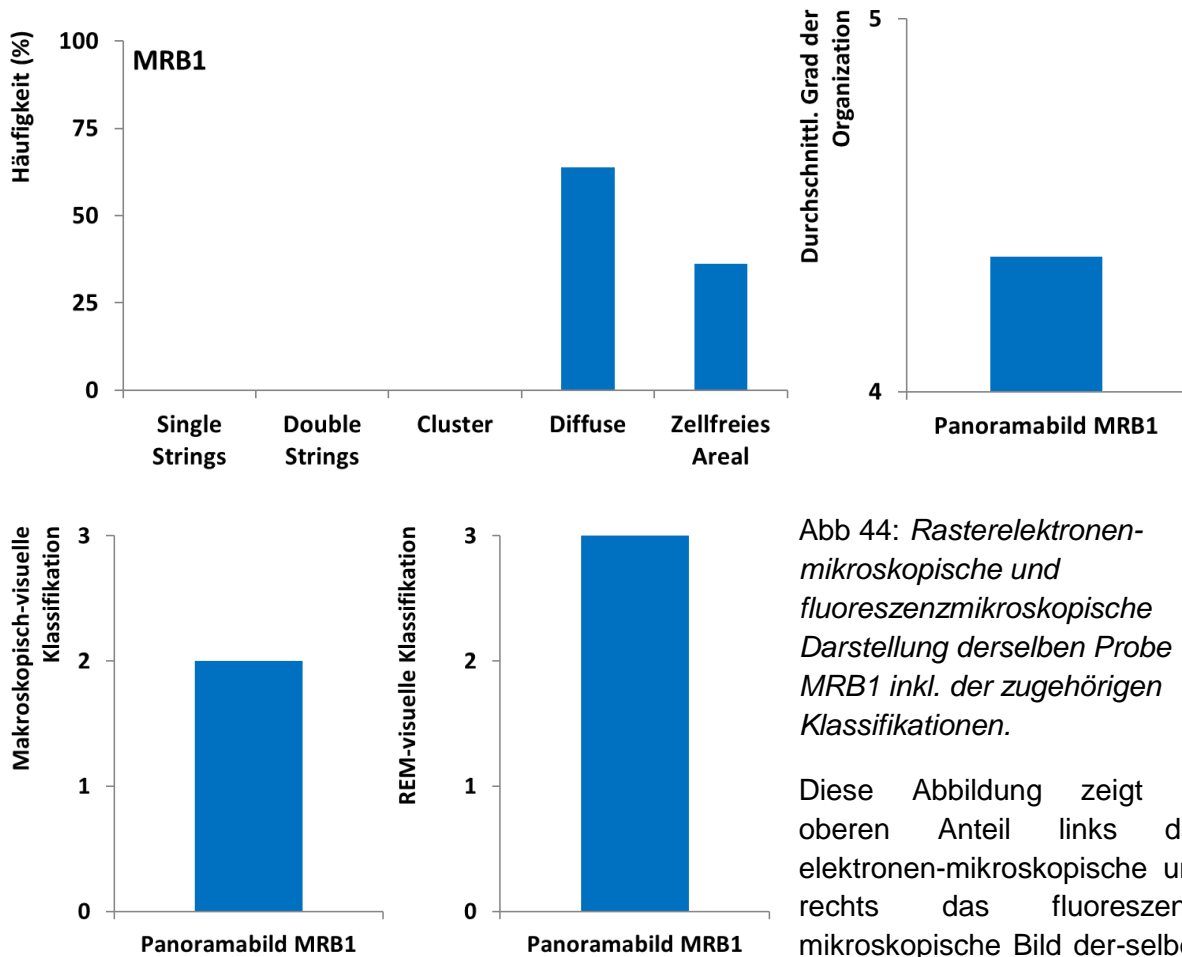
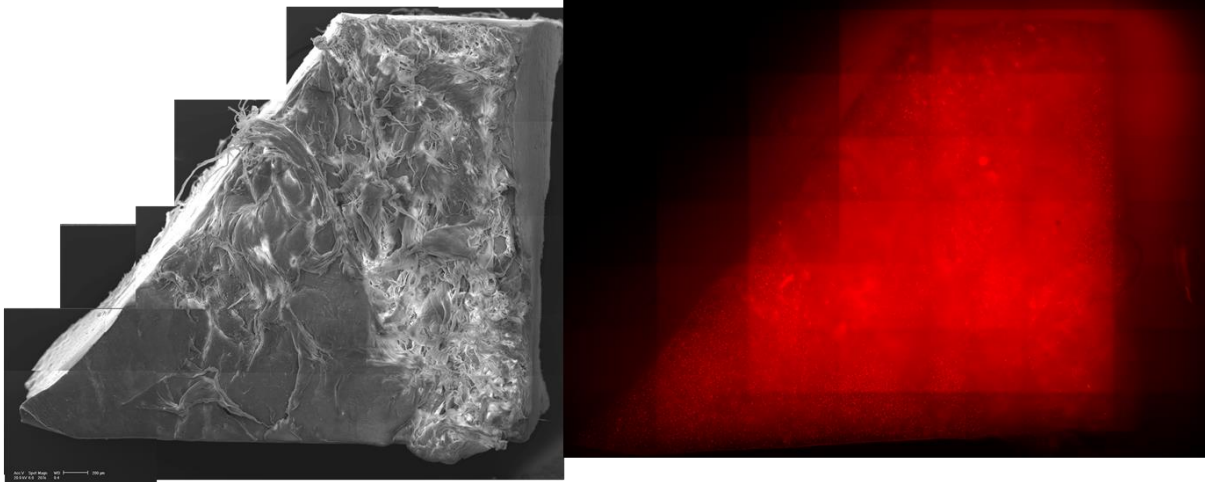


Abb 44: Rasterelektronenmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe MRB1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen.

Diese Abbildung zeigt im oberen Anteil links das elektronen-mikroskopische und rechts das fluoreszenz-mikroskopische Bild der-selben Probe in den gewählten

Größenverhältnissen. In der Mitte findet sich links die lokale, kachel-basierte Häufigkeit der Organisationsmuster für jede einzelne Kachel, dargestellt als Prozentsatz aller in der Fluoreszenzmikroskopie gescorten Kacheln, rechts daneben der errechnete Durchschnittswert der Organisation für die gesamte Probe. Unten in der Abbildung zeigt sich links der zugehörige makroskopisch-visuelle Score und rechts der zugehörige globale REM-visuelle Score der gesamten Probe.

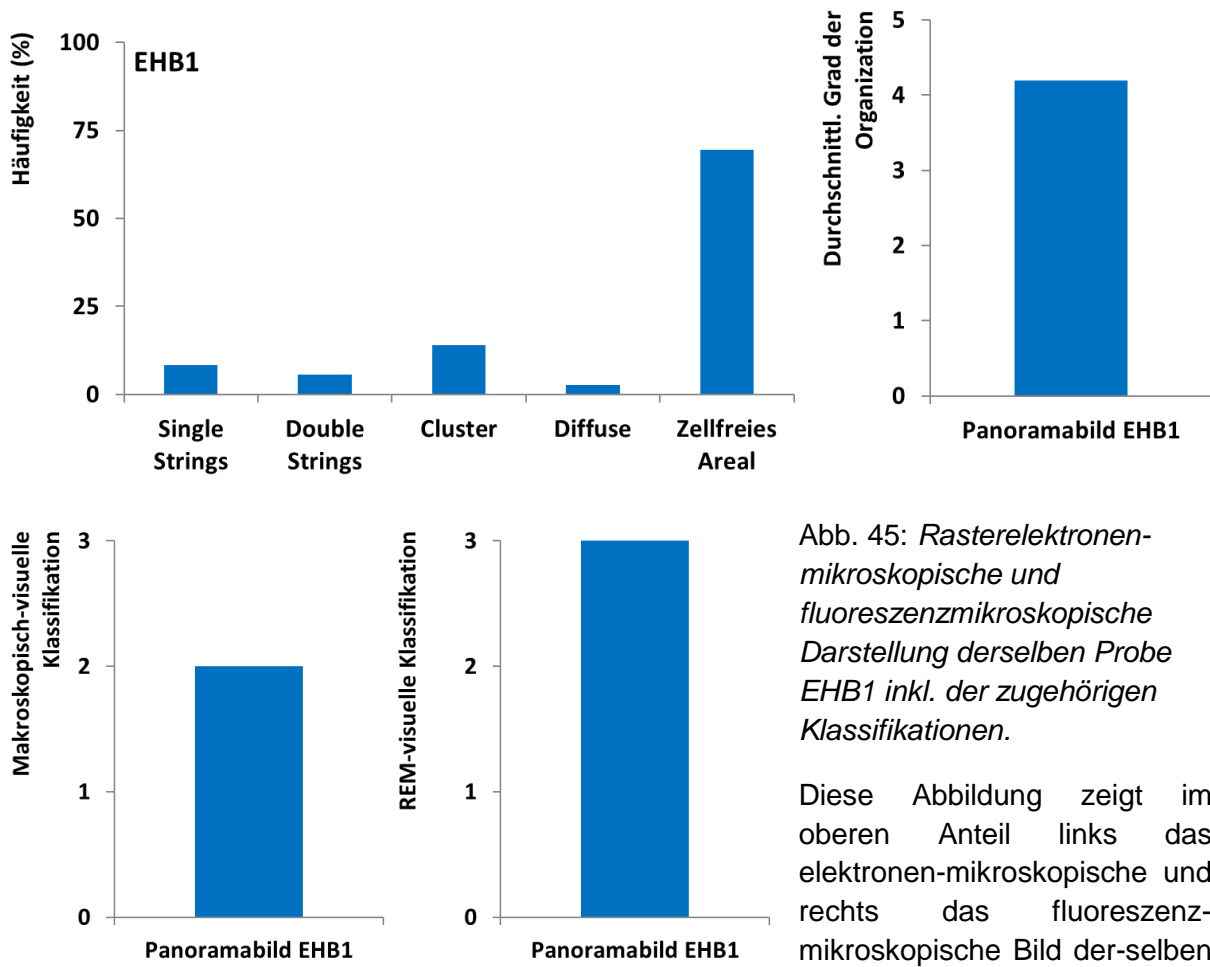
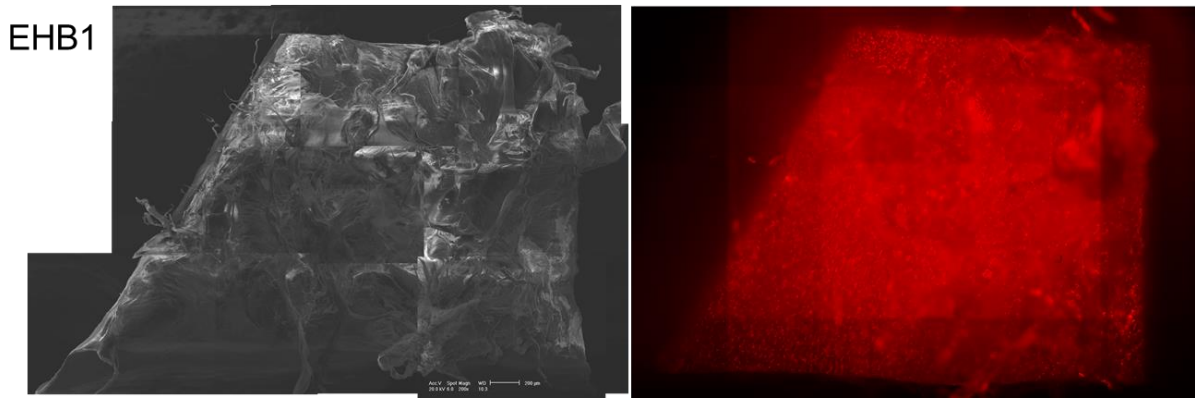


Abb. 45: Rasterelektronenmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe EHB1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen.

Diese Abbildung zeigt im oberen Anteil links das elektronen-mikroskopische und rechts das fluoreszenz-mikroskopische Bild der-selben Probe in den gewählten

Größenverhältnissen. In der Mitte findet sich links die lokale, kachel-basierte Häufigkeit der Organisationsmuster für jede einzelne Kachel, dargestellt als Prozentsatz aller in der Fluoreszenzmikroskopie gescorten Kacheln, rechts daneben der errechnete Durchschnittswert der Organisation für die gesamte Probe. Unten in der Abbildung zeigt sich links der zugehörige makroskopisch-visuelle Score und rechts der zugehörige globale REM-visuelle Score der gesamten Probe.

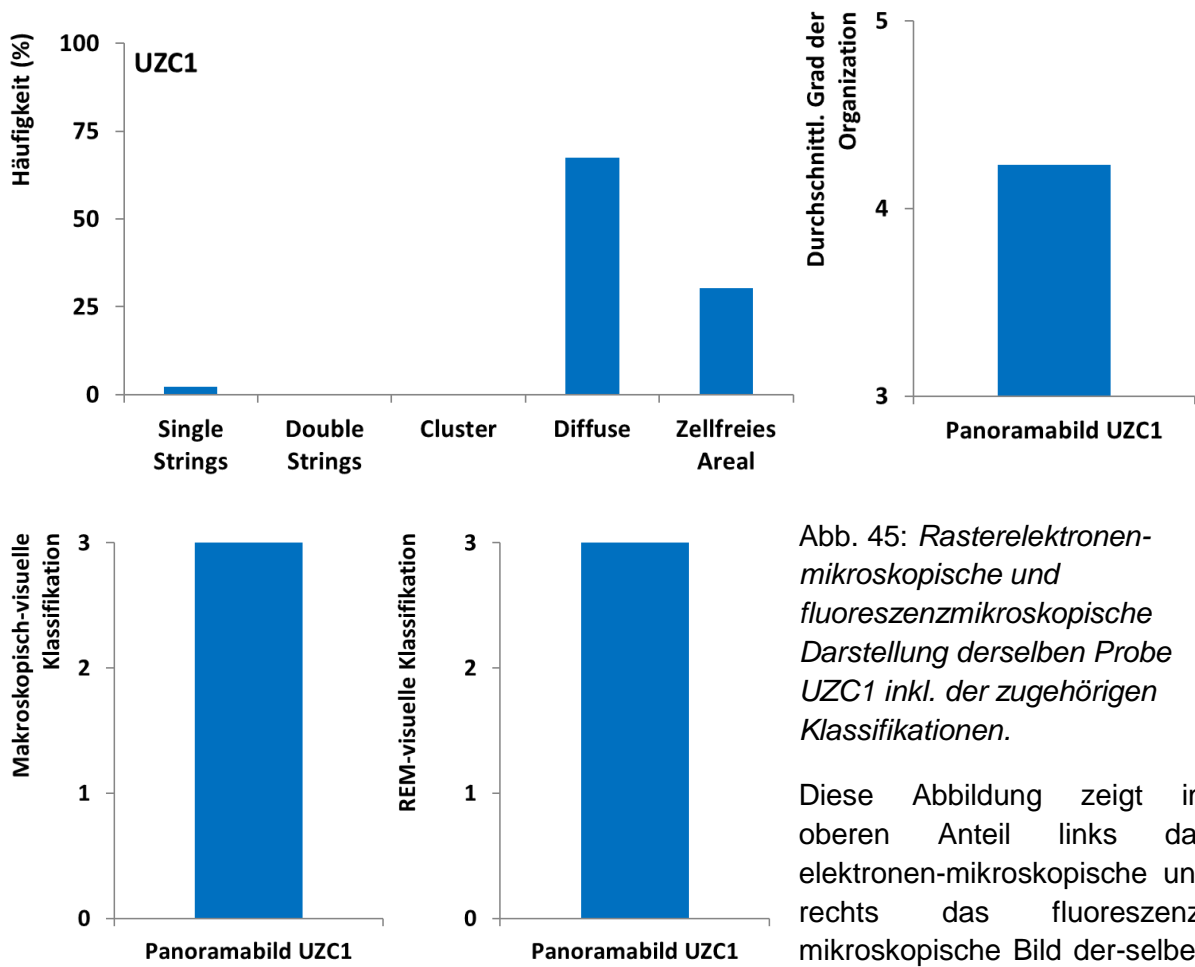
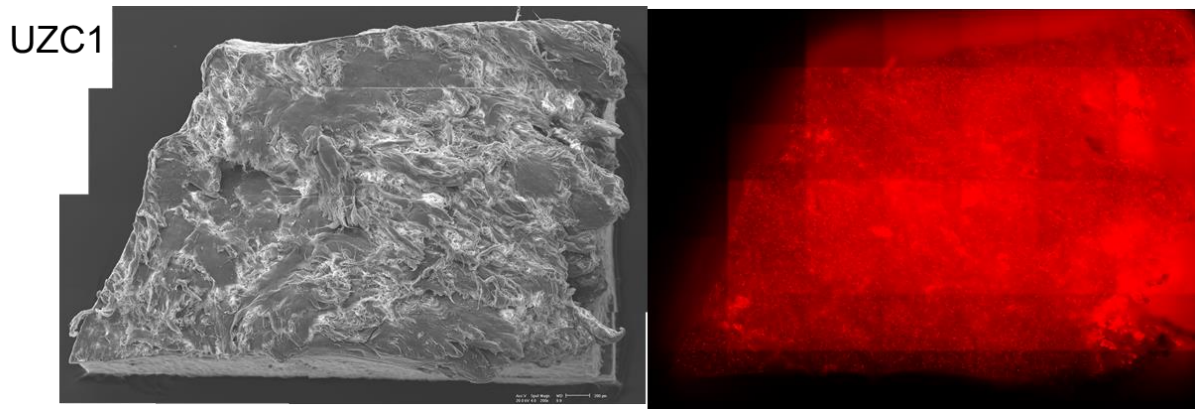


Abb. 45: Rasterelektronenmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe UZC1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen.

Diese Abbildung zeigt im oberen Anteil links das elektronen-mikroskopische und rechts das fluoreszenz-mikroskopische Bild der-selben Probe in den gewählten

Größenverhältnissen. In der Mitte findet sich links die lokale, kachel-basierte Häufigkeit der Organisationsmuster für jede einzelne Kachel, dargestellt als Prozentsatz aller in der Fluoreszenzmikroskopie gescorten Kacheln, rechts daneben der errechnete Durchschnittswert der Organisation für die gesamte Probe. Unten in der Abbildung zeigt sich links der zugehörige makroskopisch-visuelle Score und rechts der zugehörige globale REM-visuelle Score der gesamten Probe.

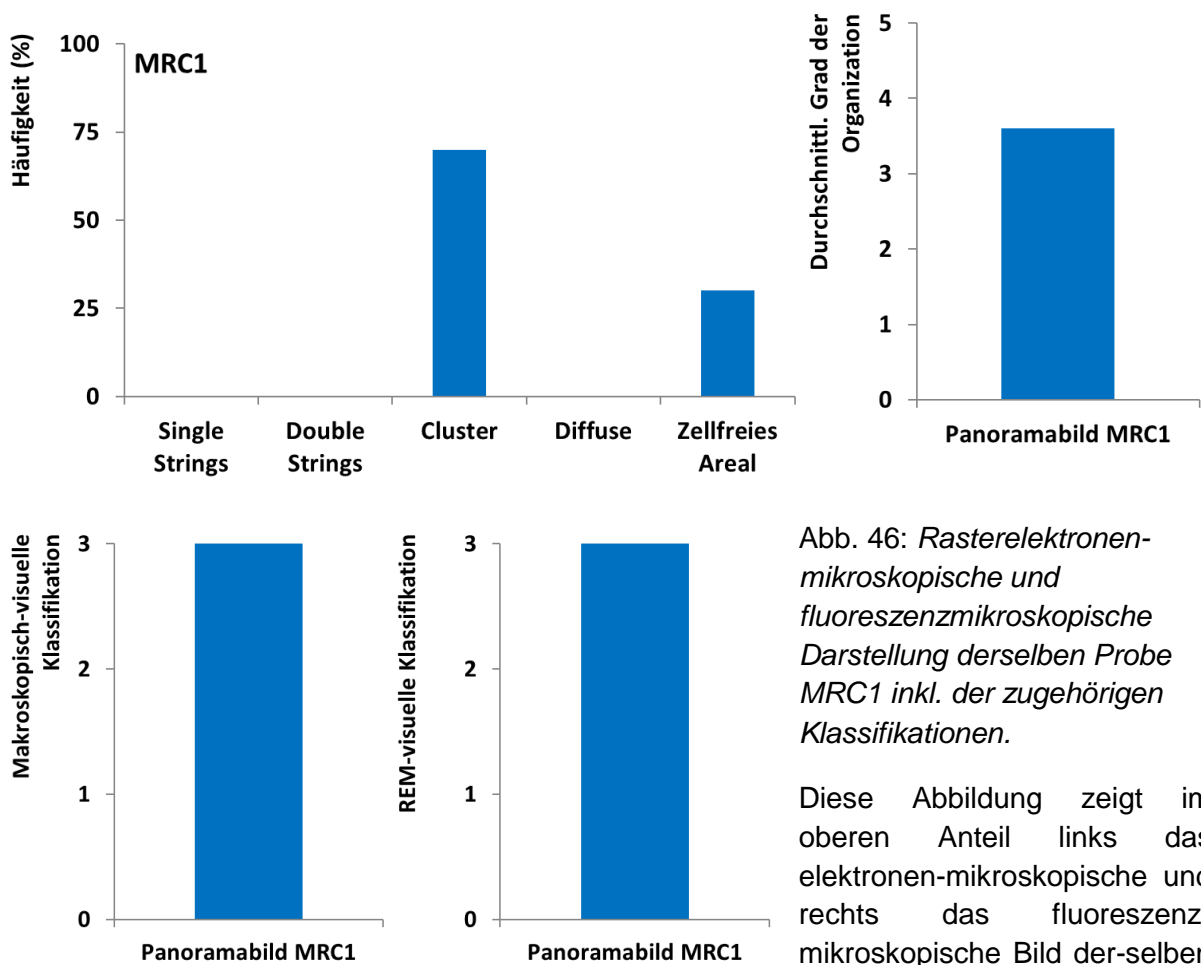
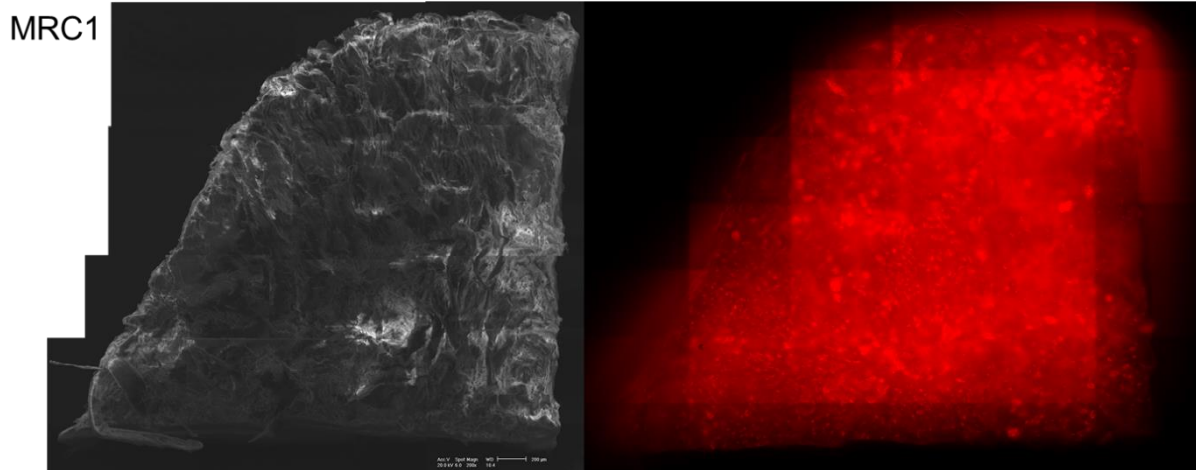


Abb. 46: Rasterelektronenmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe MRC1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen.

Diese Abbildung zeigt im oberen Anteil links das elektronen-mikroskopische und rechts das fluoreszenz-mikroskopische Bild der-selben Probe in den gewählten

Größenverhältnissen. In der Mitte findet sich links die lokale, kachel-basierte Häufigkeit der Organisationsmuster für jede einzelne Kachel, dargestellt als Prozentsatz aller in der Fluoreszenzmikroskopie gescorten Kacheln, rechts daneben der errechnete Durchschnittswert der Organisation für die gesamte Probe. Unten in der Abbildung zeigt sich links der zugehörige makroskopisch-visuelle Score und rechts der zugehörige globale REM-visuelle Score der gesamten Probe.

EHC1

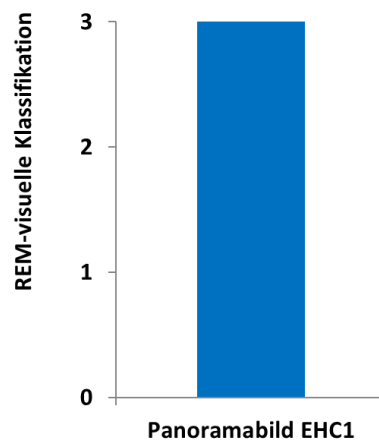
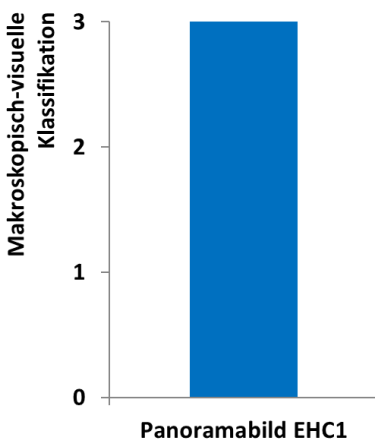
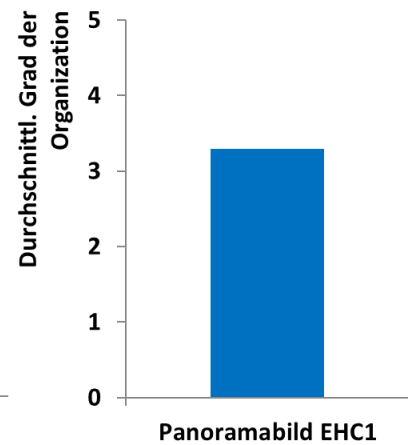
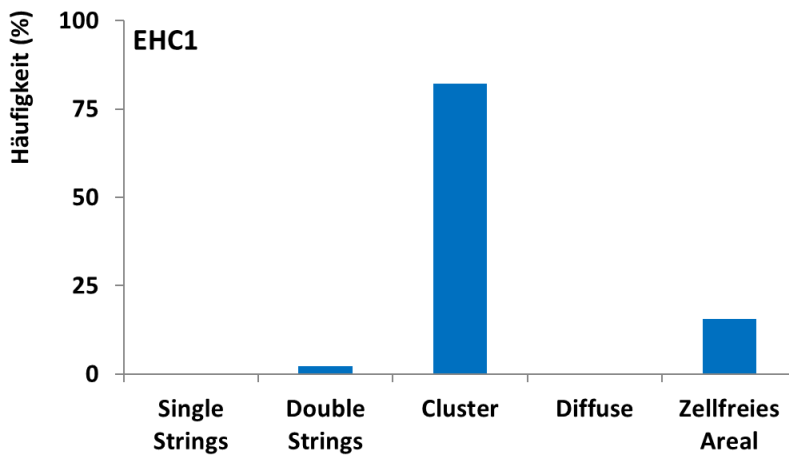
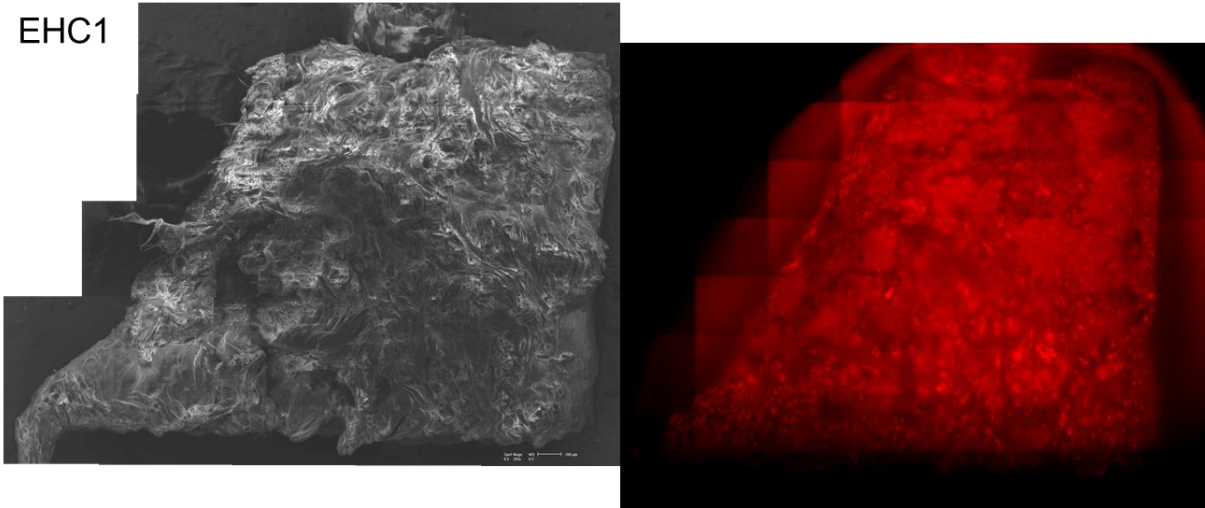


Abb. 47: Rasterelektronenmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe EHC1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen.

Diese Abbildung zeigt im oberen Anteil links das elektronen-mikroskopische und rechts das fluoreszenz-mikroskopische Bild der-selben Probe in den gewählten

Größenverhältnissen. In der Mitte findet sich links die lokale, kachel-basierte Häufigkeit der Organisationsmuster für jede einzelne Kachel, dargestellt als Prozentsatz aller in der Fluoreszenzmikroskopie gescorten Kacheln, rechts daneben der errechnete Durchschnittswert der Organisation für die gesamte Probe. Unten in der Abbildung zeigt sich links der zugehörige makroskopisch-visuelle Score und rechts der zugehörige globale REM-visuelle Score der gesamten Probe.

LKC1

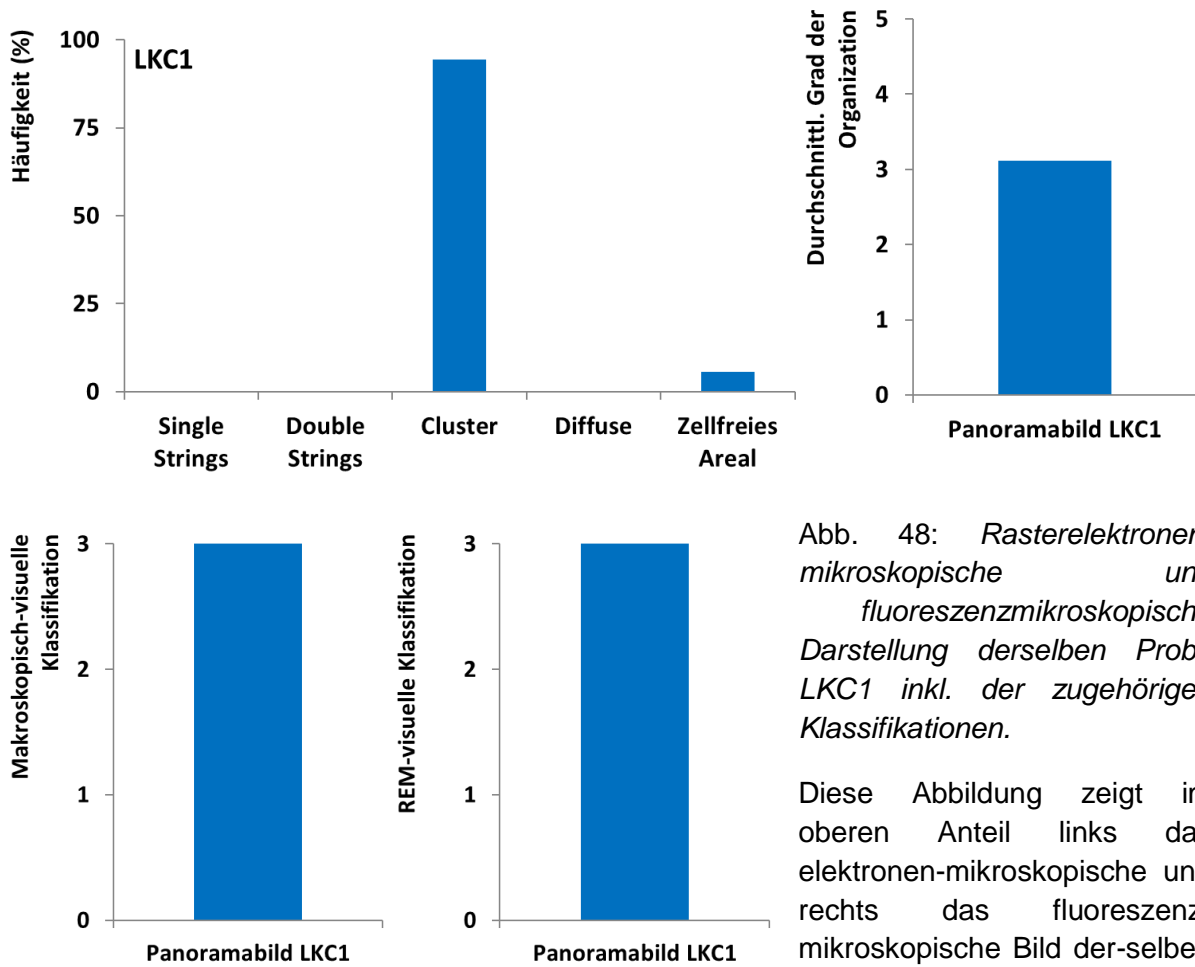
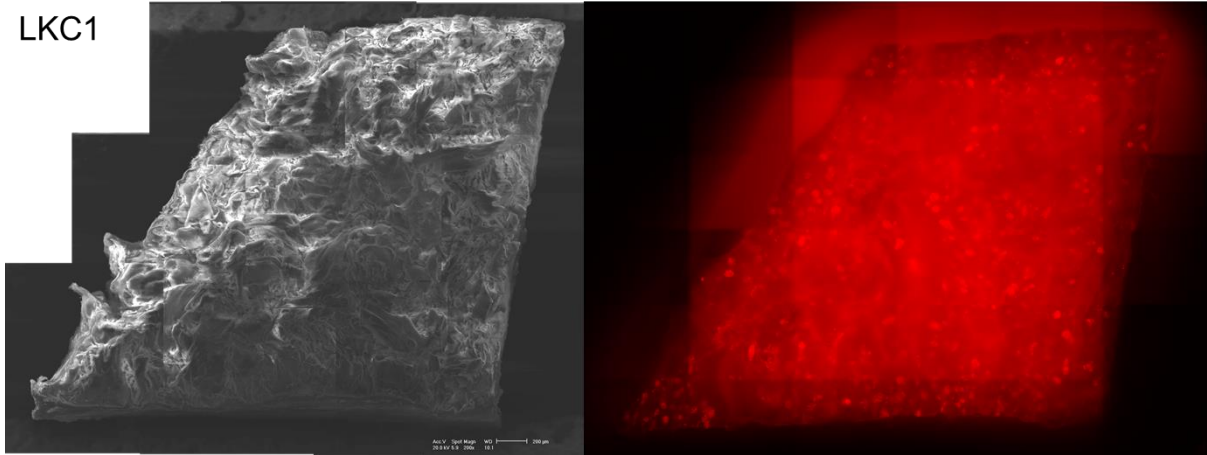


Abb. 48: Rasterelektronenmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung derselben Probe LKC1 inkl. der zugehörigen Klassifikationen.

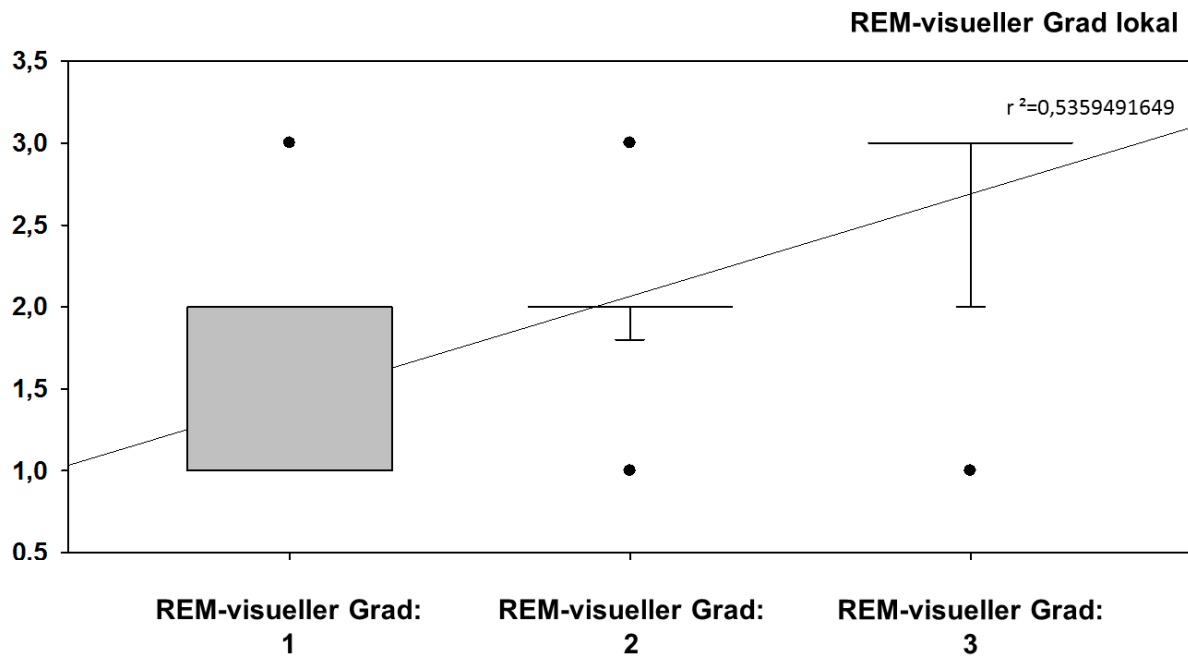
Diese Abbildung zeigt im oberen Anteil links das elektronen-mikroskopische und rechts das fluoreszenz-mikroskopische Bild der-selben Probe in den gewählten

Größenverhältnissen. In der Mitte findet sich links die lokale, kachel-basierte Häufigkeit der Organisationsmuster für jede einzelne Kachel, dargestellt als Prozentsatz aller in der Fluoreszenzmikroskopie gescorten Kacheln, rechts daneben der errechnete Durchschnittswert der Organisation für die gesamte Probe. Unten in der Abbildung zeigt sich links der zugehörige makroskopisch-visuelle Score und rechts der zugehörige globale REM-visuelle Score der gesamten Probe.

Die oben dargestellten Daten zeigen in der globalen Betrachtung einer Probe insgesamt, dass Proben mit einer makroskopisch-visuellen Einteilung von 1 eine REM-visuelle Einteilung von 1 bis 2 und räumliche Organisationsmuster von 2,2 bis 3,3 aufwiesen. Proben mit einer makroskopisch-visuellen Einteilung von 2 zeigten eine REM-visuelle Einteilung von 1 bis 3 und räumliche Organisationsmuster von 2,1 bis 4,3. Proben mit einer makroskopisch-visuellen Einteilung von 3 zeigten eine REM-visuelle Einteilung ebenfalls von 1 bis 3 und räumliche Organisationsmuster von 2,1 bis 4,2.

3.3 Analyse signifikanter Unterschiede und Korrelationen der einzelnen optisch-visuellen Klassifikationen („Scores“)

Im Folgenden werden nun sowohl **Proben-basiert (gesamt-global)** wie auch **Kachel-basiert (lokal)** die Ergebnisse sowie die Unterschiede und signifikanten Korrelationen in der Analyse der einzelnen optisch-visuellen Klassifikationen graphisch und tabellarisch dargestellt.



	REM-lokal		
	REM-visuell 1	REM-visuell 2	REM-visuell 3
REM-visuell 1	x		
REM-visuell 2		x	
REM-visuell 3			x

Abb. 49: Unterschiede im **lokalen**, kachel-bezogenen REM-visuellen Grad der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

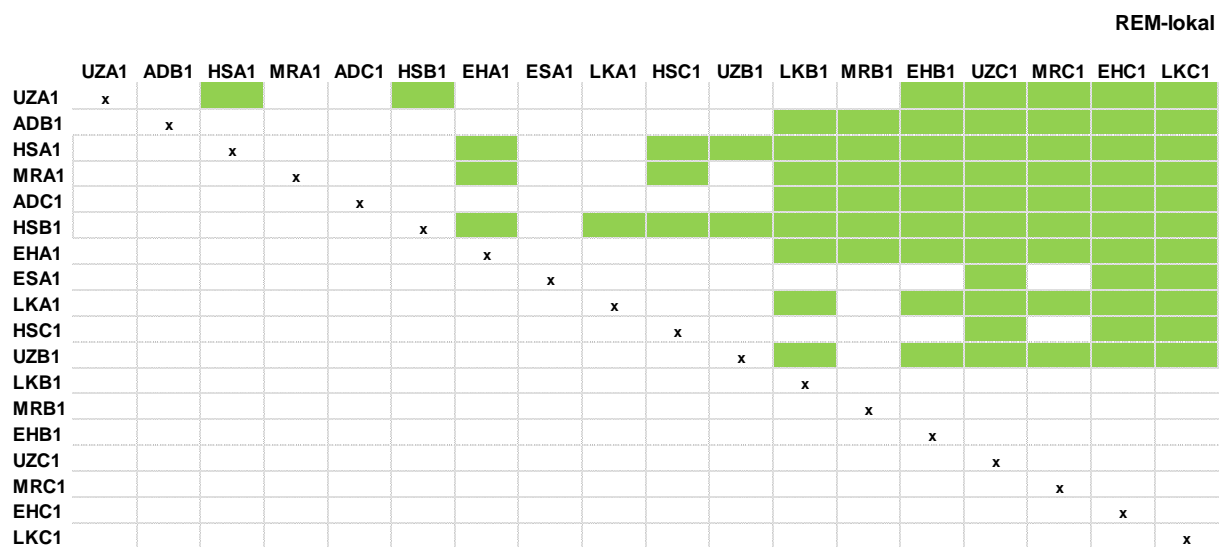
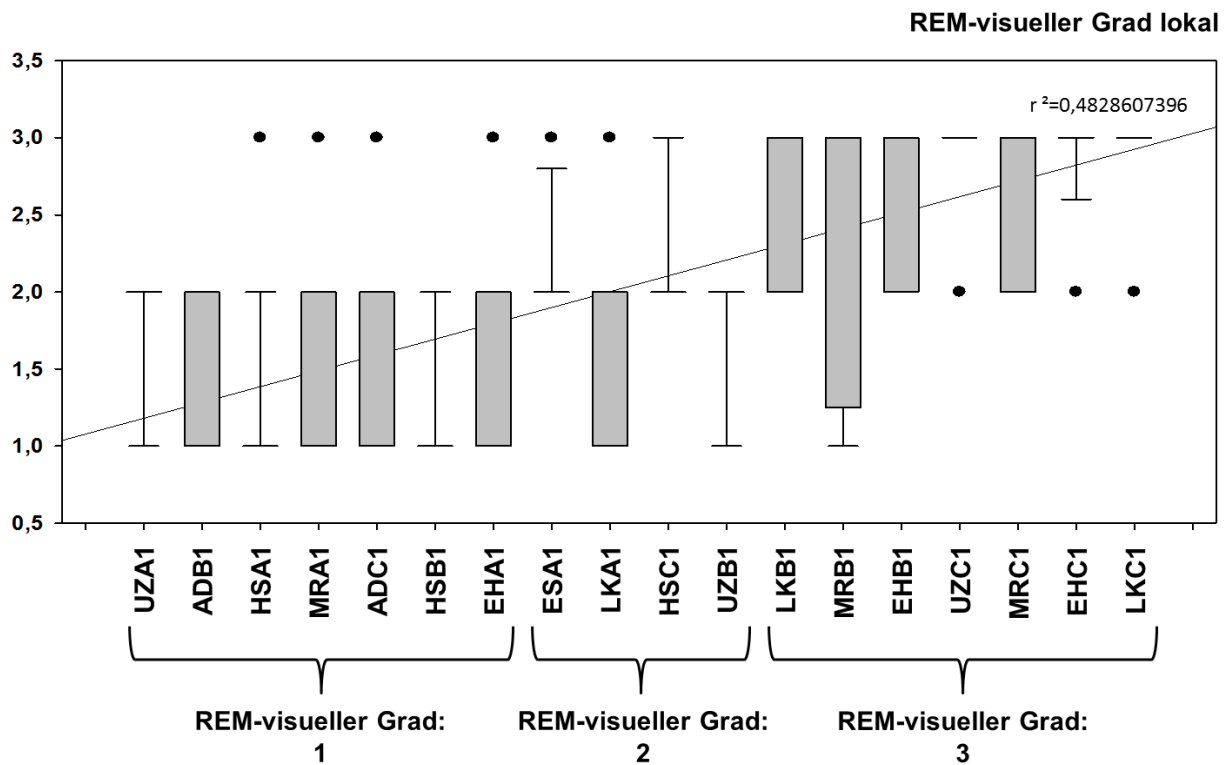
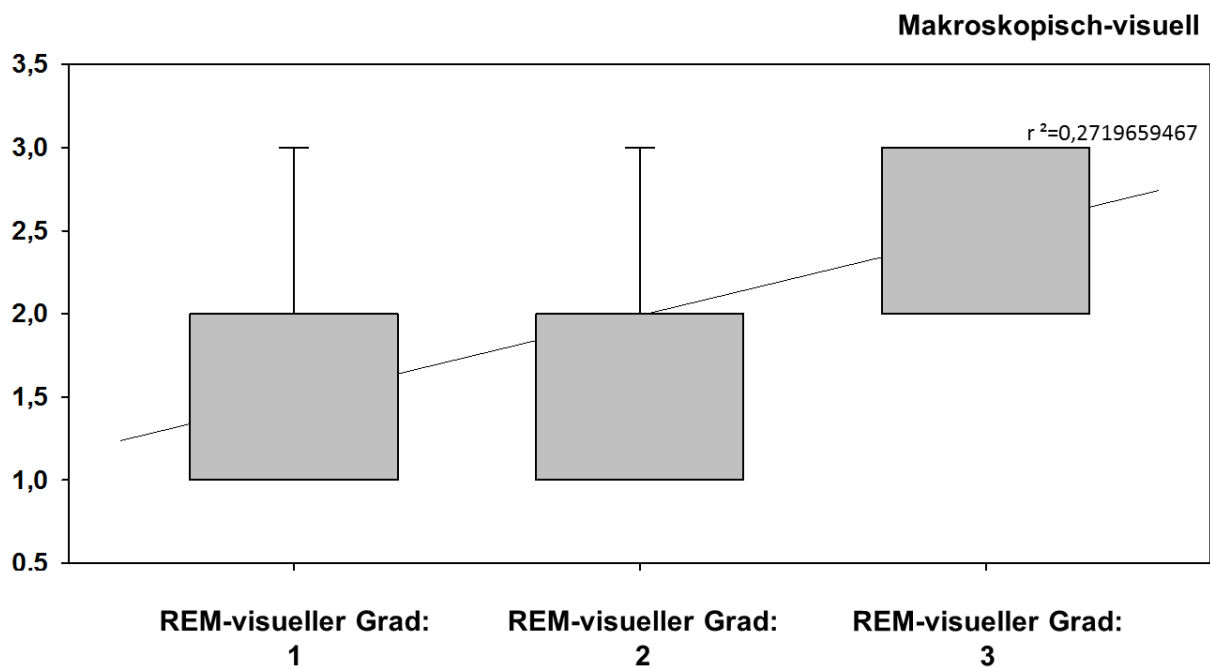


Abb. 50: Unterschiede im **lokalen**, kachel-bezogenen REM-visuellen Grad der lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.



Makroskopisch-visuell

	REM-visuell 1	REM-visuell 2	REM-visuell 3
REM-visuell 1	x		
REM-visuell 2		x	
REM-visuell 3			x

Abb. 51: Unterschiede im Makroskopisch-visuellen Grad der Schädigung der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

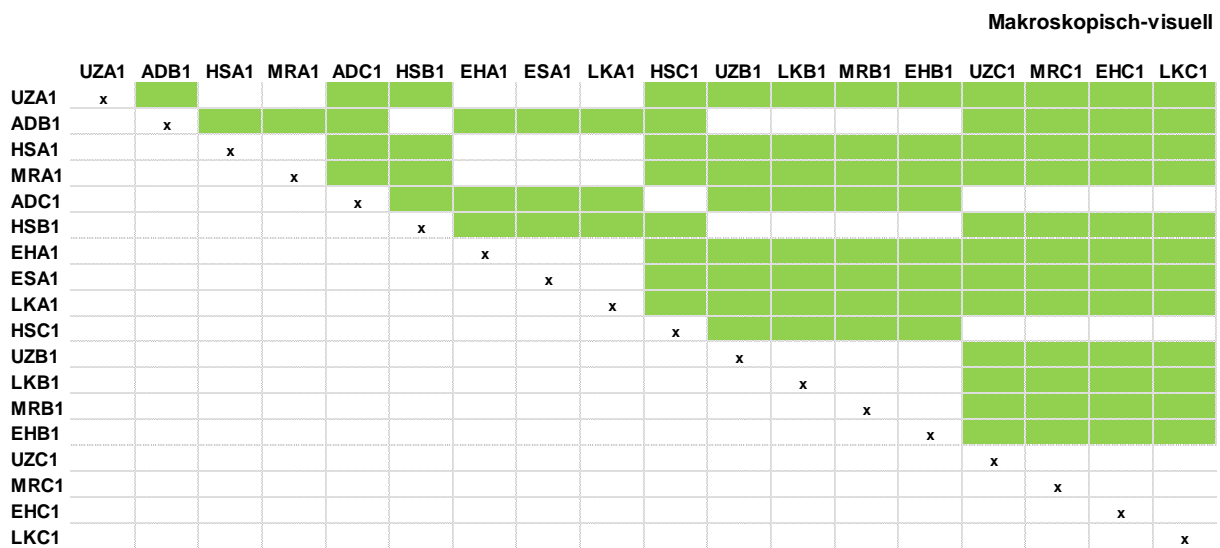
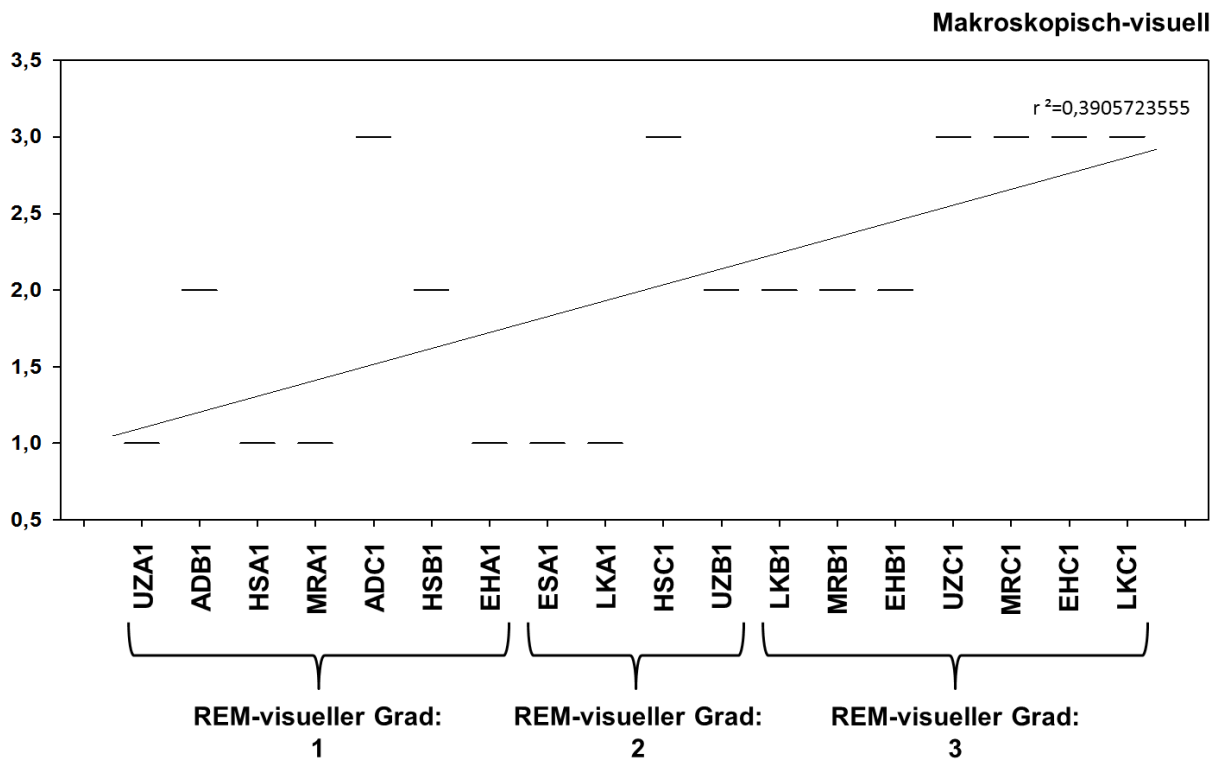
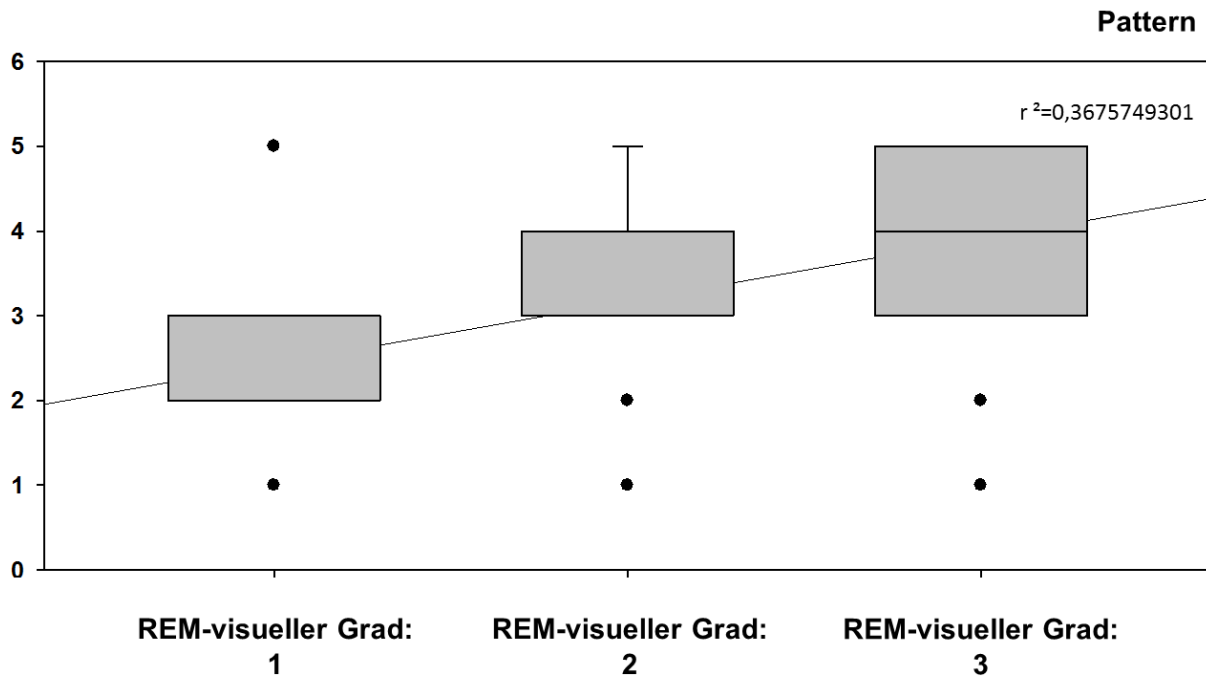


Abb. 52: Unterschiede im Makroskopisch-visuellen Grad der Schädigung der lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.



	Pattern		
	REM-visuell 1	REM-visuell 2	REM-visuell 3
REM-visuell 1	x		
REM-visuell 2		x	
REM-visuell 3			x

Abb. 53: Unterschiede im **globalen** Pattern der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grünfarbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

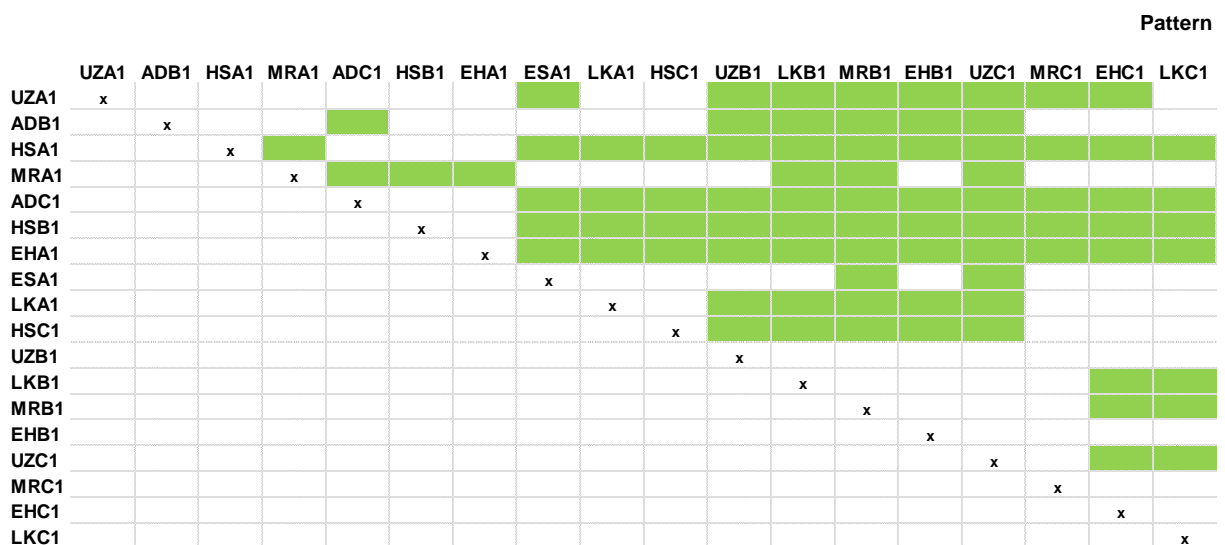
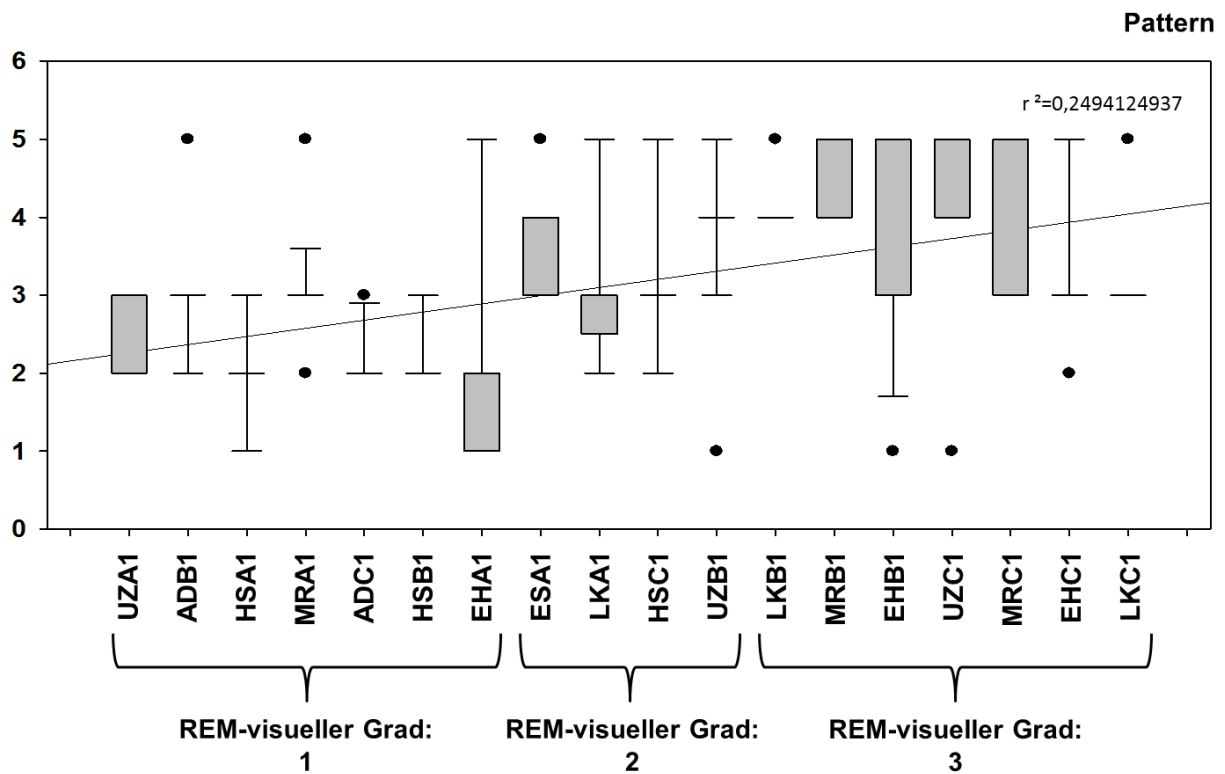


Abb. 54: Unterschiede im **lokalen** Pattern der isolieren, lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

Die oben dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Kategorisierung der Proben nach ihrer globalen REM-visuellen Einteilung zu signifikanten Unterschieden in der räumlichen Organisation, der makroskopisch-visuellen Einteilung und der lokalen REM-visuellen Einteilung führten.

Bei dieser lokalen, kachel-basierten Analyse zeigte sich bei Proben, die global in den REM-visuellen Schädigungsgrad 1 eingeteilt wurden, eine kachel-basierte REM-visuelle Schädigung in den Schweregraden 1 bis 3. Gleiches galt für die globale Schädigungsgrade 2 und 3. Bei beiden wurden jeweils kachel-basierte REM-visuelle Schädigungen im Grad 1 und 3 gefunden. Bei dieser lokalen, kachel-basierten Analyse zeigte sich bei Proben, die global in den REM-visuellen Schädigungsgrad 1 und 2 eingeteilt wurden, jeweils makroskopisch-visuelle Schädigungen im Grad 1 bis 3, im globalen REM-visuellen Schädigungsgrad 3 makroskopisch-visuelle Schädigungen im Grad 2 und 3. Bei dieser lokalen, kachel-basierten Analyse zeigten sich in allen globalen REM-visuellen Schädigungsgraden, jeweils Schädigungsausmaße in der räumlichen Verteilungen (Pattern) in den Graden 1 bis 3.

Aus diesem Grund werden die nachfolgend aufgeführten Ergebnisse der durchgeführten Pearson-Product- Korrelations-Analyse tabellarisch sowohl global wie auch lokal dargestellt.

Proben-basierte, globale Pearson-Product-Correlation	REM vis globale Probe	ELMi vis Kachel- basiert	Makroskop. visuell	Pattern
		0,919	0,54	0,827
ELMi vis ges. Probe		6,97E-08	0,0207	0,000023
		18	18	18
			0,615	0,697
ELMi vis Kachel-basiert			0,00657	0,00132
			18	18
				0,292
Makroskop. Visuell				0,24
				18
Pattern				

Tab. 8: Proben-basierte (**globale**) Korrelationsanalyse der untersuchten einzelnen optisch-visuellen Klassifikationen. (Obere Zahl: Correlation Coefficient, mittlere Zahl: p-Wert, untere Zahl: Anzahl der Proben; Signifikanz grün markiert bei $p < 0,05$)

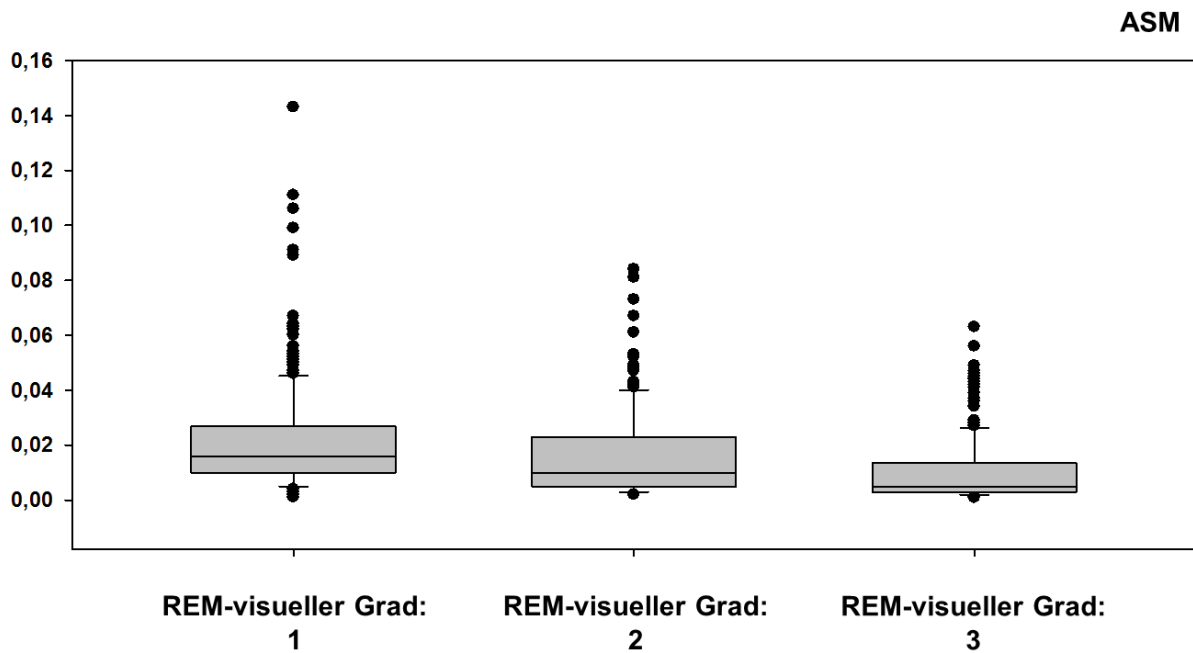
Kachel-basierte, lokale Pearson-Product-Correlation	REM vis globale Probe	ELMi vis Kachel- basiert	Makroskop. visuell	Pattern
		0,0732	0,522	0,474
ELMi vis ges. Probe		5,227E-132	1,11E-55	6,44E-45
		781	781	781
			0,47	0,474
ELMi vis Kachel-basiert			2,92E-44	6,44E-45
			781	781
				0,21
Makroskop. Visuell				3,39E-09
				781
Pattern				

Tab. 9: Kachel-basierte (**lokale**) Korrelationsanalyse der untersuchten einzelnen optisch-visuellen Klassifikationen. (Obere Zahl: Correlation Coefficient, mittlere Zahl: p-Wert, untere Zahl: Anzahl der Proben; Signifikanz grün markiert bei $p < 0,05$)

Von den dargestellten **lokalen**, Kachel-basierten Korrelationen korrelieren von sechs möglichen alle sechs miteinander. Dagegen zeigen sich in der **Proben**-basierten Betrachtung der Korrelationsanalyse nur fünf Korrelationen. Zwischen dem makroskopisch-visuellen Schaden und dem Pattern bestand in der **globalen** Analyse keine Korrelation. Weiterhin zeigten sie zwischen globaler und lokaler Analyse-Methode Unterschiede in den resultierenden Korrelations-Koeffizienten. Dementsprechend scheint eine Kachel-basierte, **lokale** Betrachtung der Korrelationsanalyse unter Umständen genauere Informationen zu enthalten und für weiteren Analysen gegebenenfalls geeigneter zu sein, was zum Teil an der deutlich größeren verarbeiteten Datenmenge bei Kachel-basierter Analyse liegen könnte.

3.4 Ergebnisse mit Darstellung signifikanter Unterschiede nach Texturanalyse der REM-Bilder

Im Folgenden werden nun sowohl Proben-basiert (**global**) wie auch Kachel-basiert (**lokal**) die Ergebnisse sowie die Unterschiede und signifikanten Korrelationen in der Testuranalyse der rasterelektronenmikroskopischen Bilder graphisch und tabellarisch dargestellt.



ASM

	REM-visuell 1	REM-visuell 2	REM-visuell 3
REM-visuell 1	x		
REM-visuell 2		x	
REM-visuell 3			x

Abb. 55: Unterschiede im **globalen** Angular Second Moment der Textur-analysierten REM-Aufnahmen der gesamten Probenoberflächen in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab.

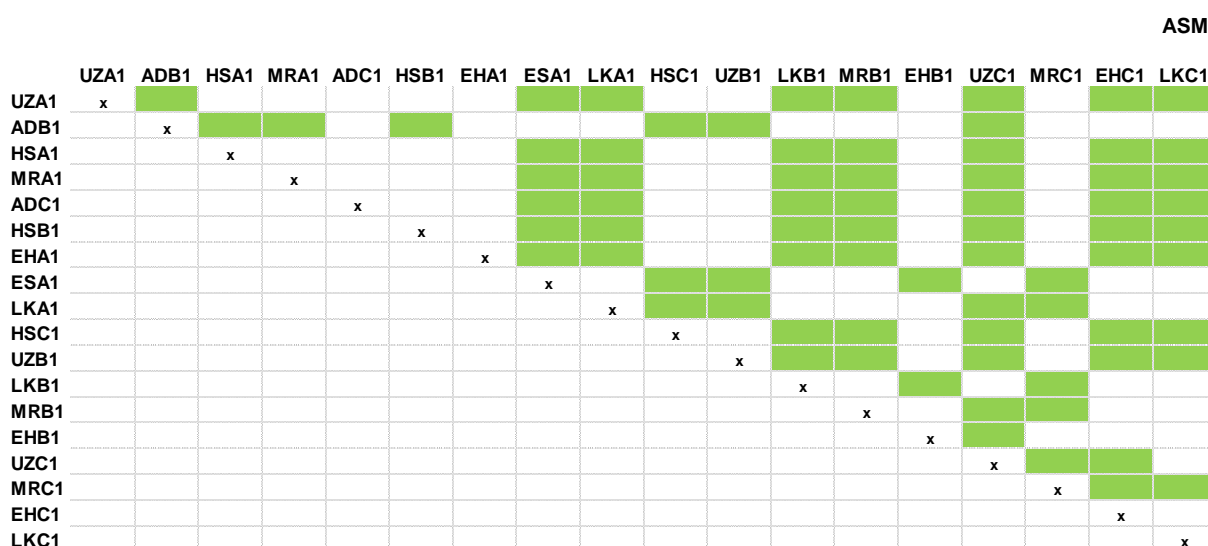
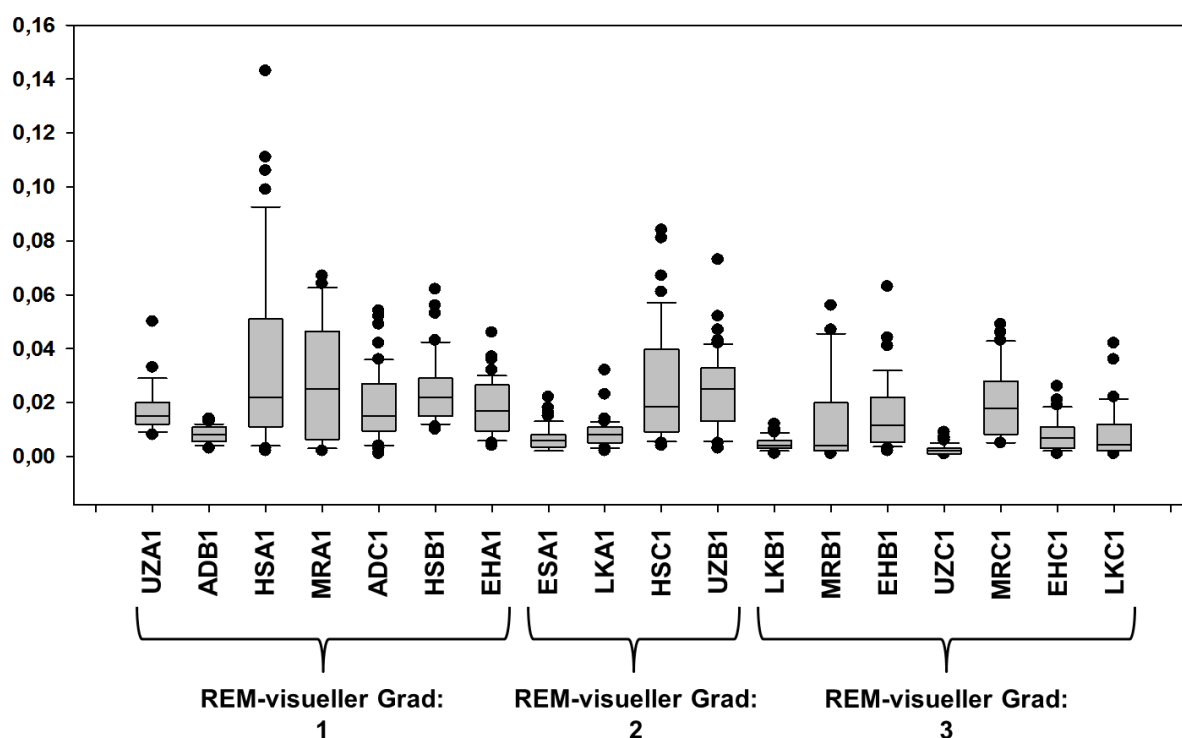
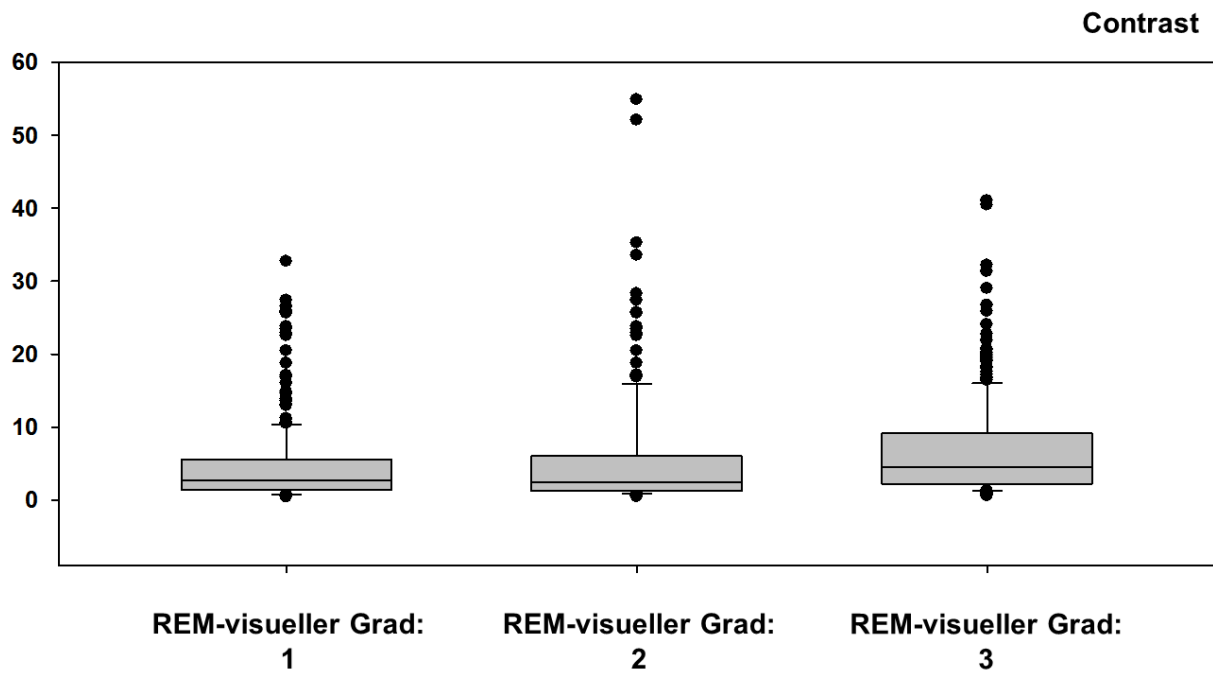


Abb. 56: Unterschiede im **lokalen** Angular Second Moment der Textur-analysierten REM-Aufnahmen der lokalen Probenoberfläche-Kacheln in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab.



	Contrast		
	REM- visuell 1	REM- visuell 2	REM- visuell 3
REM-visuell 1	x		
REM-visuell 2		x	
REM-visuell 3			x

Abb. 57: Unterschiede im **globalen** Contrast der Textur-analysierten REM-Aufnahmen der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab.

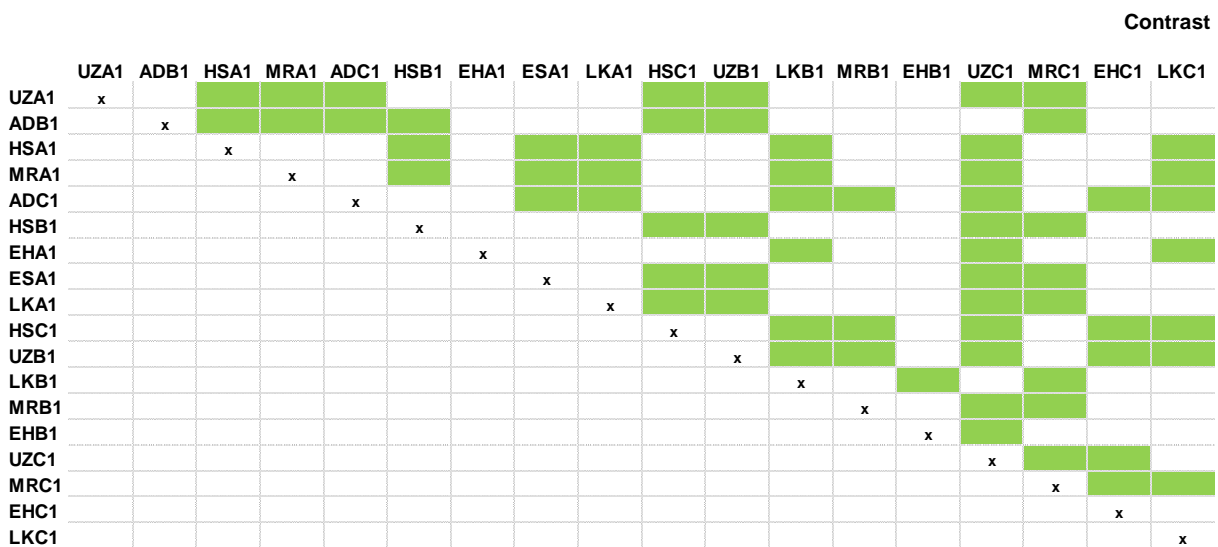
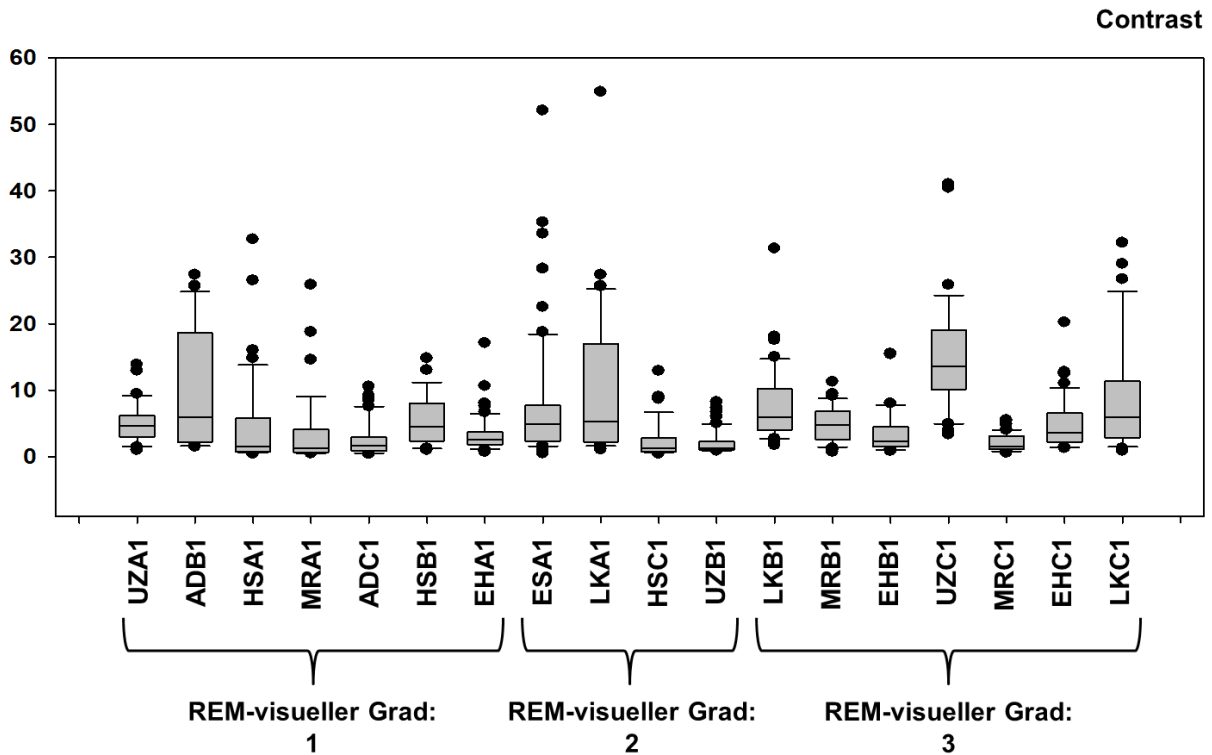
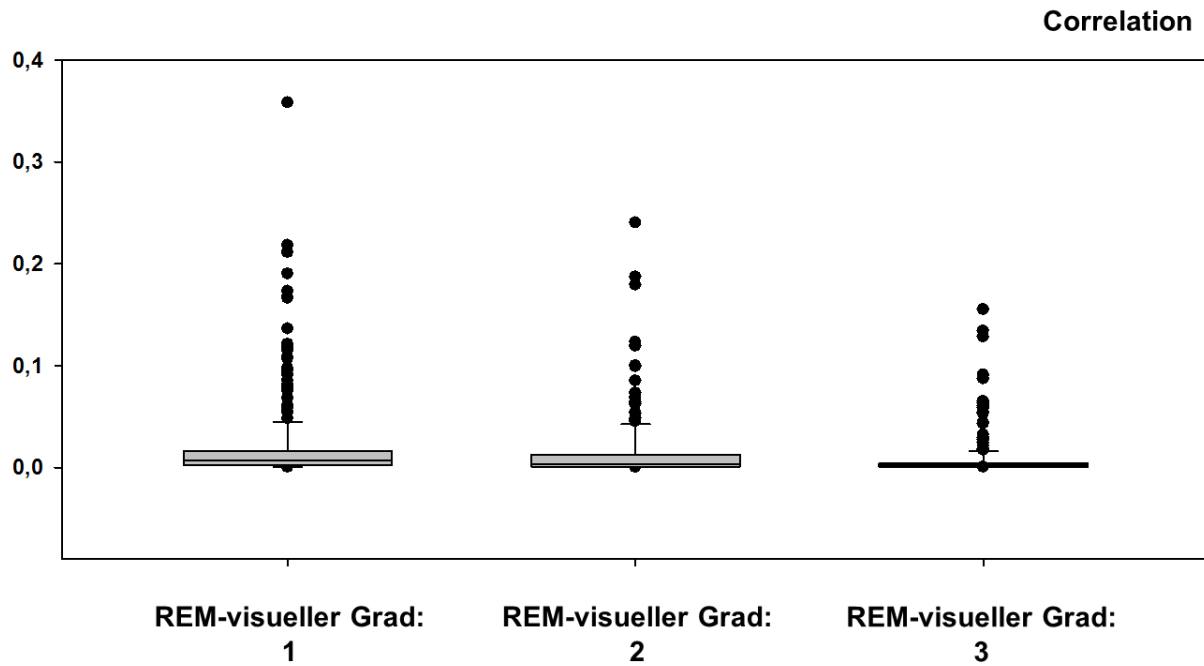


Abb. 58: Unterschiede im Contrast der Textur-analysierten REM-Aufnahmen der **lokalen** Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab.



Correlation

	REM-visuell 1	REM-visuell 2	REM-visuell 3
REM-visuell 1	x		
REM-visuell 2		x	
REM-visuell 3			x

Abb. 59: Unterschiede in der **globalen** Correlation der Textur-analysierten REM-Aufnahmen der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab.

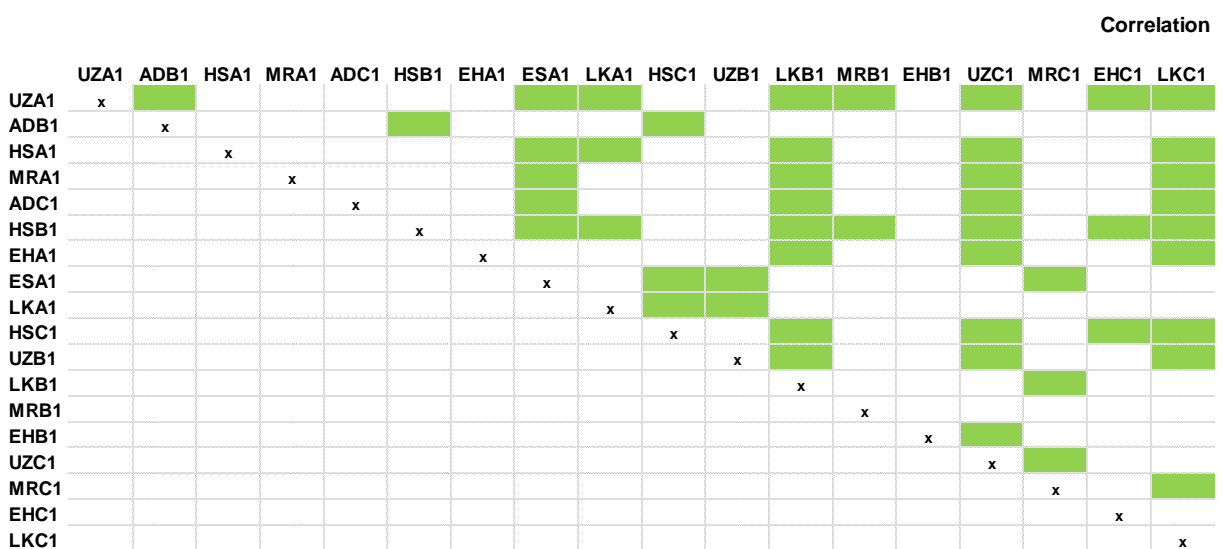
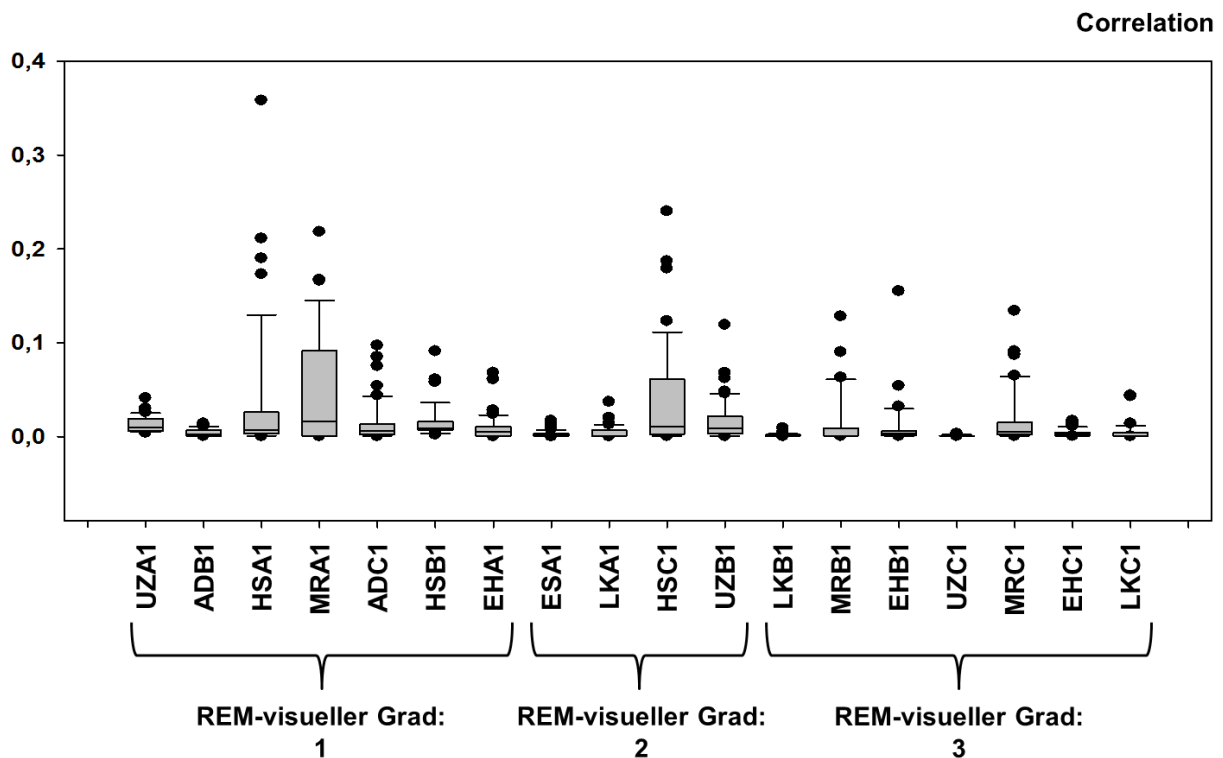
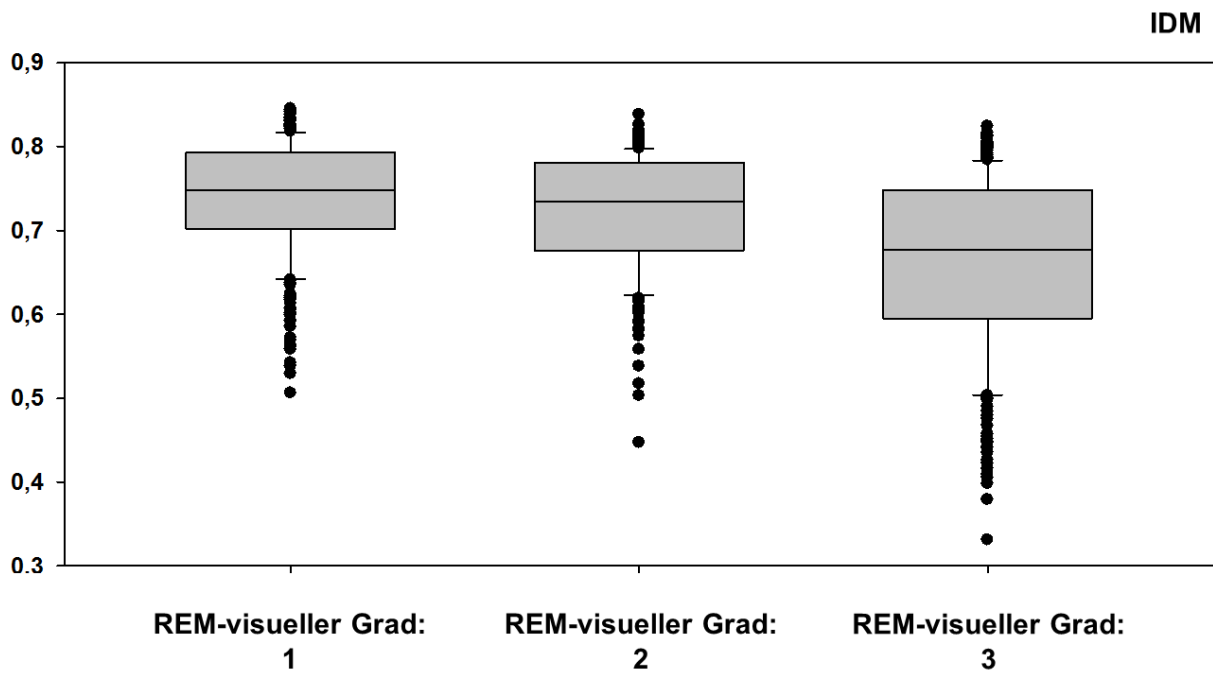


Abb. 60: Unterschiede in der **lokalen** Correlation der Textur-analysierten REM-Aufnahmen der lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab.



IDM

	REM-visuell 1	REM-visuell 2	REM-visuell 3
REM-visuell 1	x		
REM-visuell 2		x	
REM-visuell 3			x

Abb. 61: Unterschiede **globalen** im Inverse Difference Moment (IDM) der Textur-analysierten REM-Aufnahmen der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab.

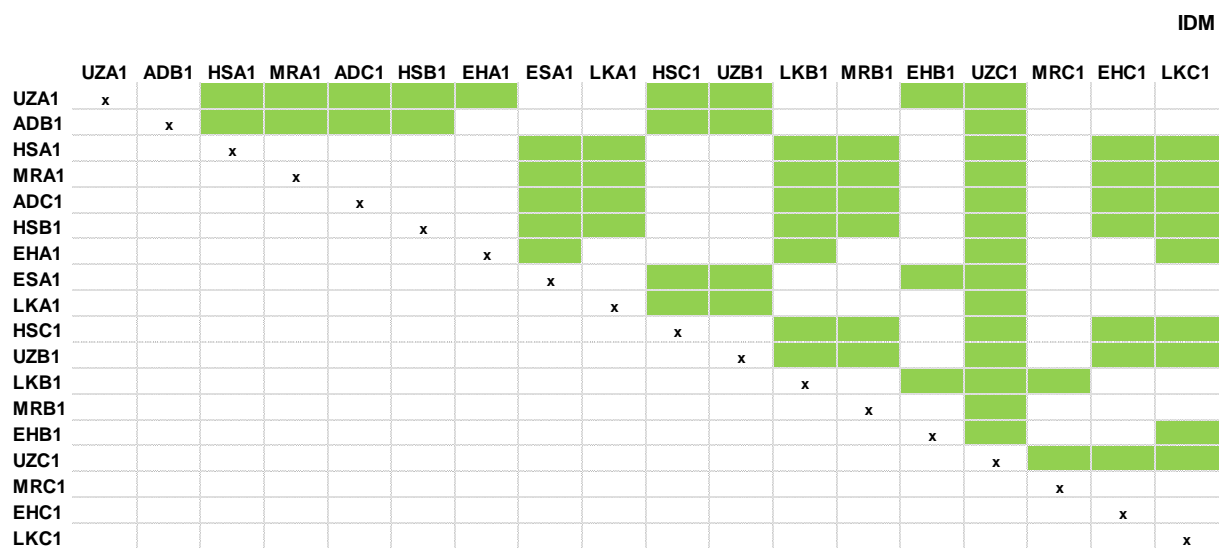
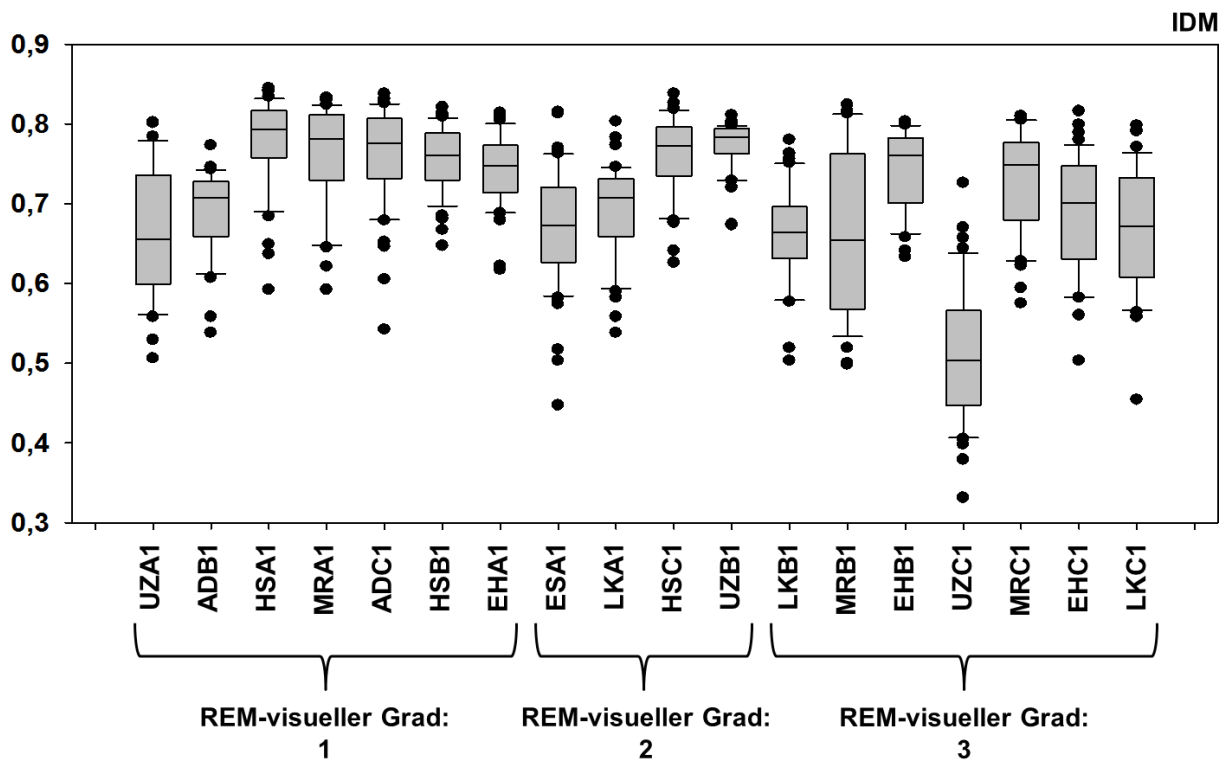
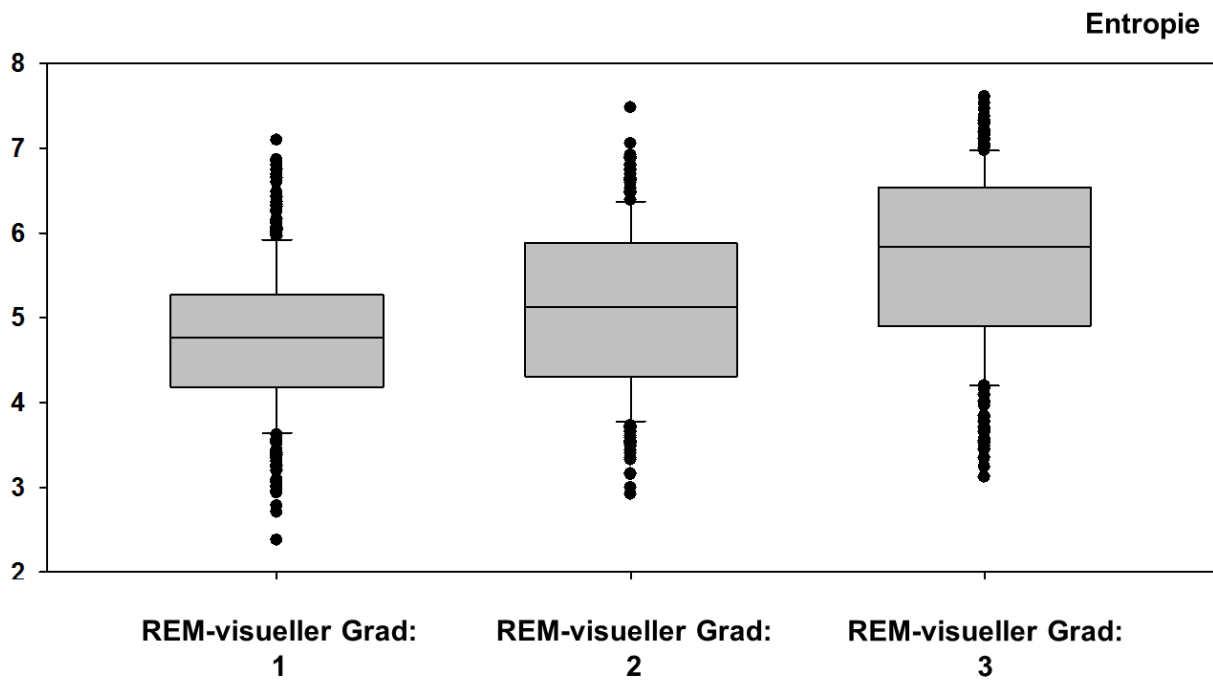


Abb. 62: Unterschiede im **lokalen** Inverse Difference Moment (IDM) der Textur-analysierten REM-Aufnahmen der lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab.



Entropie

	REM-visuell 1	REM-visuell 2	REM-visuell 3
REM-visuell 1	x		
REM-visuell 2		x	
REM-visuell 3			x

Abb. 63: Unterschiede in der **globalen** Entropie der Textur-analysierten REM-Aufnahmen der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab.

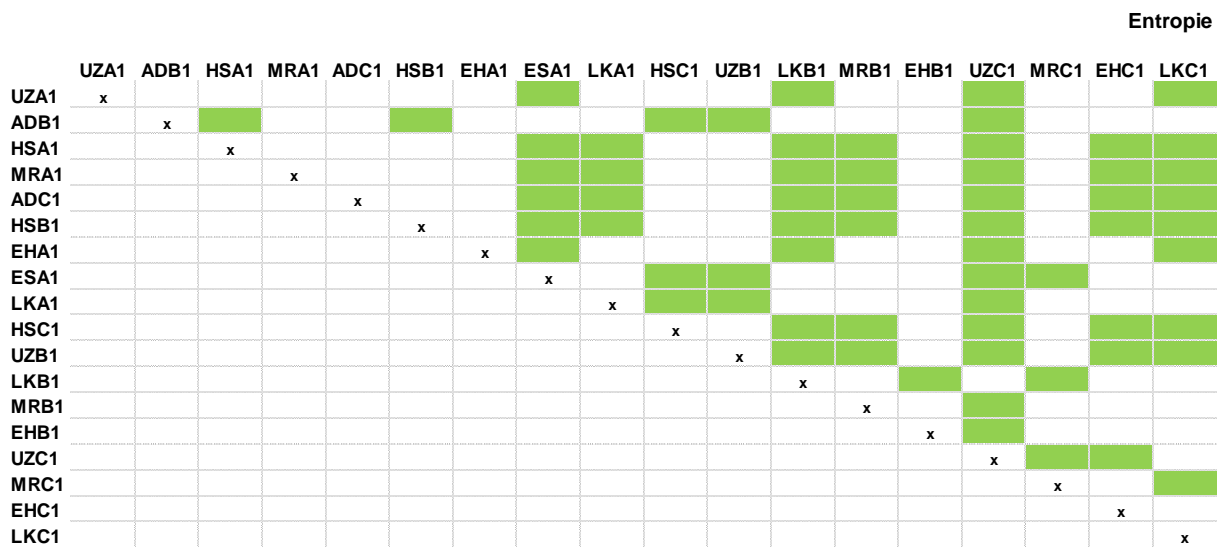
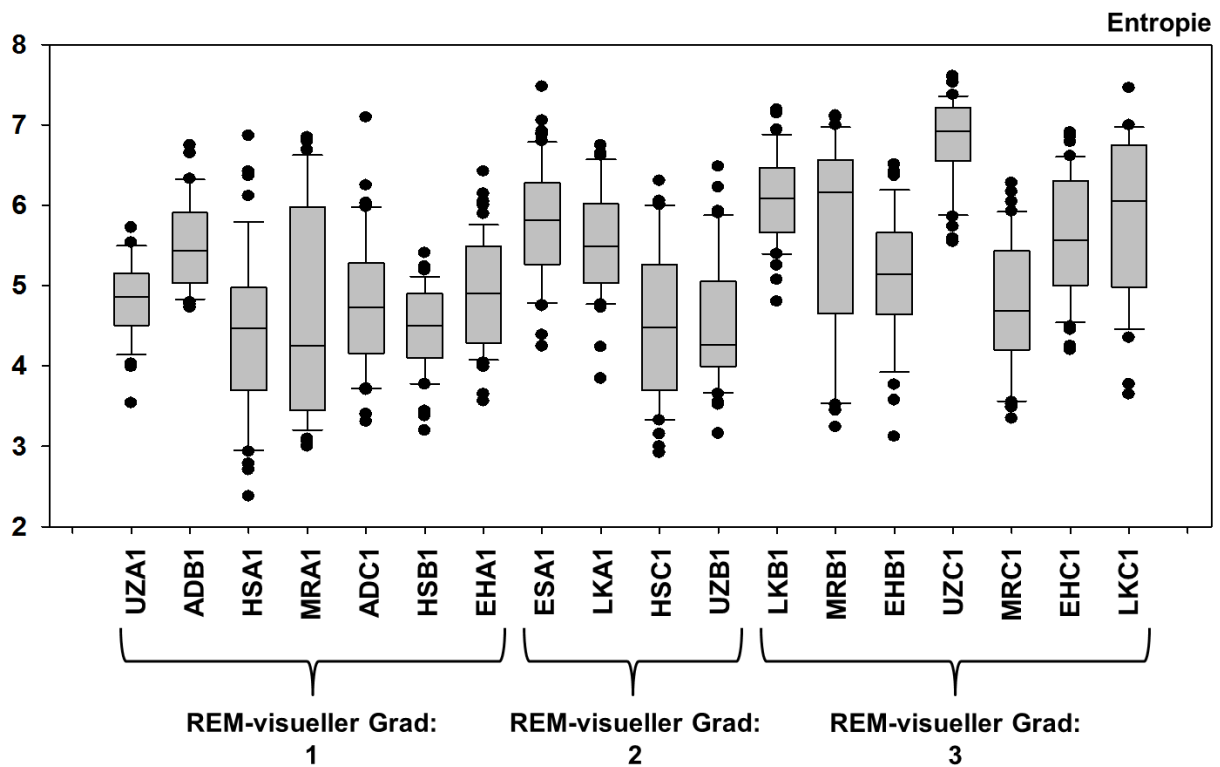


Abb. 64: Unterschiede in der **lokalen** Entropie der Textur-analysierten REM-Aufnahmen der lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab.

Die oben dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Kategorisierung der Proben nach ihrer **globalen** REM-visuellen Einteilung zu signifikanten Unterschieden in allen Texturanalysewerten führte. Es folgte eine detailliertere Analyse, in der die **lokalen**, kachel-basierten Werte aller Proben berücksichtigt wurden.

3.5 Analyse signifikanter Korrelationen zwischen den einzelnen Parametern nach Texturanalyse der REM-Bilder

Zunächst werden die signifikanten Korrelationen dargestellt, die in der **globalen** und **lokalen** Analyse der Knorpelproben aufgedeckt wurden.

Die hier aufgeführten Korrelationen verdeutlichen, dass alle Texturanalyse-Parameter miteinander korrelieren (jeweils 10 von 10 möglichen Korrelationen) und möglicherweise ein Parameter stellvertretend für alle anderen verwendet werden kann.

Proben-basierte, globale Pearson-Product-Correlation	Angular Second Moment	Contrast	Correlation	Inverse Difference Moment	Entropy
		-0,739	0,876	0,798	-0,916
Angular Second Moment		0,00046	0,00000184	0,0000716	0,000000093
		18	18	18	18
			-0,596	-0,833	0,844
Contrast			0,00902	0,0000175	0,0000106
			18	18	18
				0,62	-0,715
Correlation				0,00609	0,000856
				18	18
					-0,904
Inverse Difference Moment					0,000000261
					18
Entropy					

Tab. 10: Proben-basierte (**globale**) Korrelationsanalyse der untersuchten Grauwert-Texturanalyse-Parameter. (Obere Zahl: Correlation Coefficient, mittlere Zahl: p-Wert, untere Zahl: Anzahl der Proben; Signifikanz grün markiert bei $p < 0,05$)

Kachel-basierte, lokale Pearson-Product-Correlation	Angular Second Moment	Contrast	Correlation	Inverse Difference Moment	Entropy
		-0,428	0,857	0,63	-0,852
Angular Second Moment		4,47E-36	5,12E-227	1,09E-87	7,82E-221
		781	781	781	781
			-0,266	-0,622	0,63
Contrast			3,97E-14	8,91E-85	1,60E-87
			781	781	781
				0,404	-0,616
Correlation				5,77E-32	1,06E-82
				781	781
					-0,853
Inverse Difference Moment					2,29E-222
					781
Entropy					

Tab. 11: Kachel-basierte (**lokale**) Korrelationsanalyse der untersuchten Grauwert-Texturanalyse-Parameter. (Obere Zahl: Correlation Coefficient, mittlere Zahl: p-Wert, untere Zahl: Anzahl der Proben; Signifikanz grün markiert bei $p < 0,05$)

Im Folgenden werden nun Kachel-basiert (**lokal**) signifikante Korrelationen zwischen den einzelnen in der Texturanalyse der rasterelektronenmikroskopischen Bilder erhobenen Parametern graphisch inklusive Bestimmtheitsmaß dargestellt. Am Ende der Darstellung erfolgt die Angabe, welche der dargestellten paarweisen Korrelationen auch in der probenbasierten, **globalen** Betrachtungsweise einen signifikanten Zusammenhang aufwiesen. Auf die graphische Darstellung jener Korrelationsanalysen wurde aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit allerdings verzichtet.

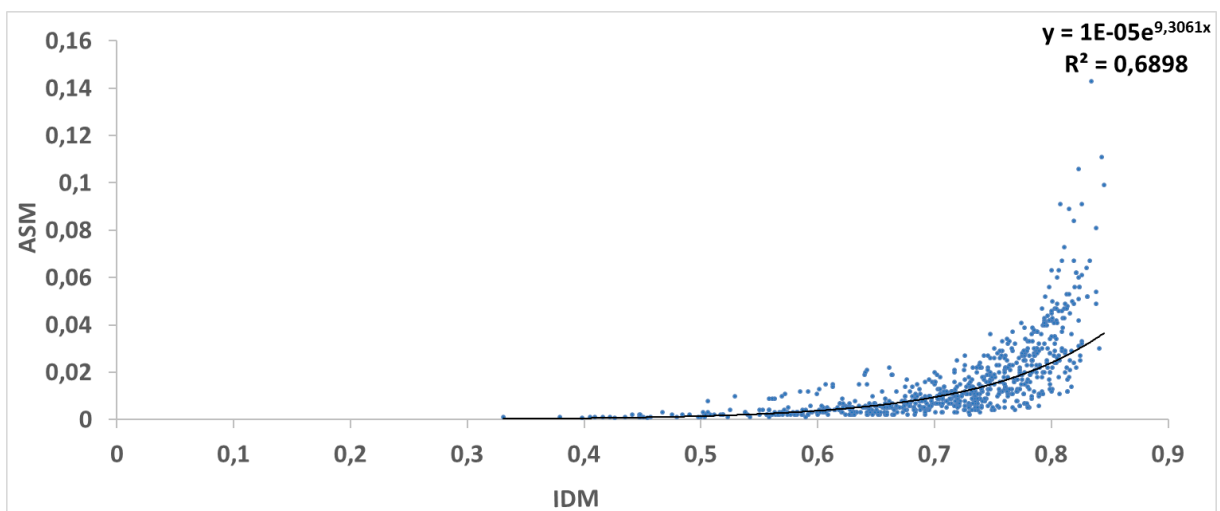
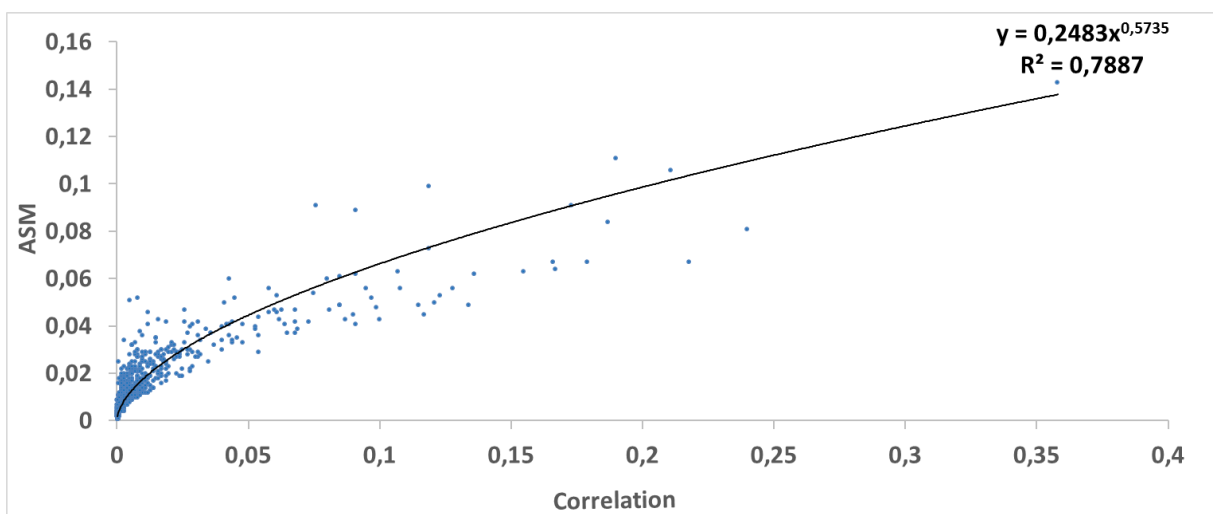
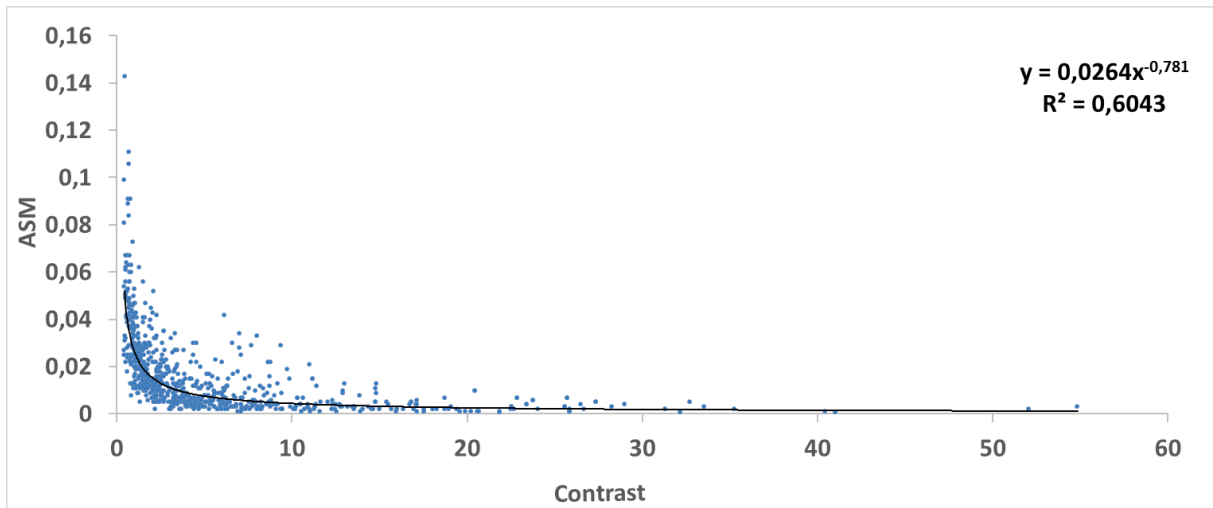


Abb. 65: Punktwolken-Diagramm von ASM und Contrast (oben), ASM und Correlation (mittig) sowie ASM und IDM (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der **lokal-Kachel-basierten** Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

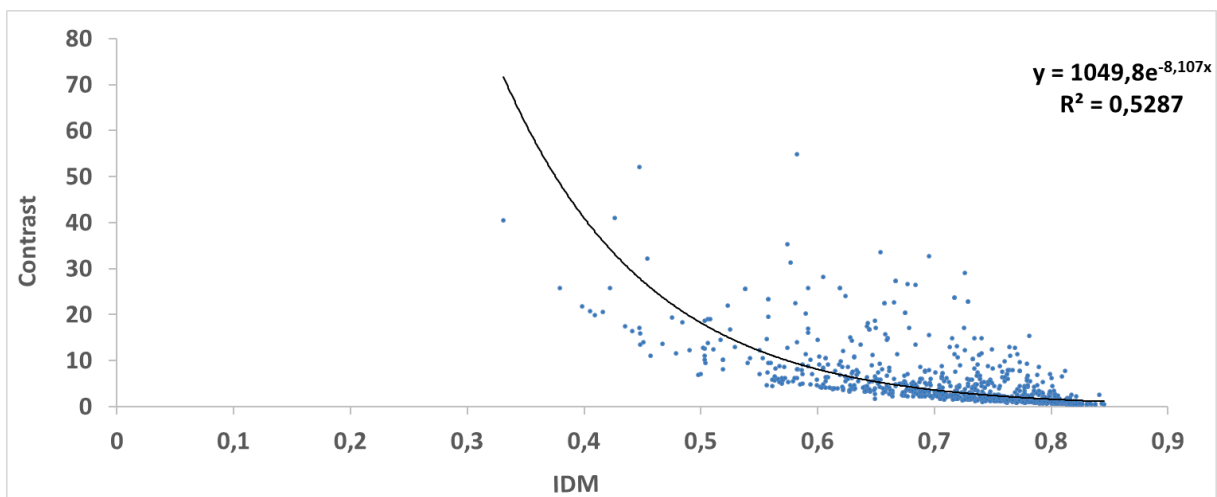
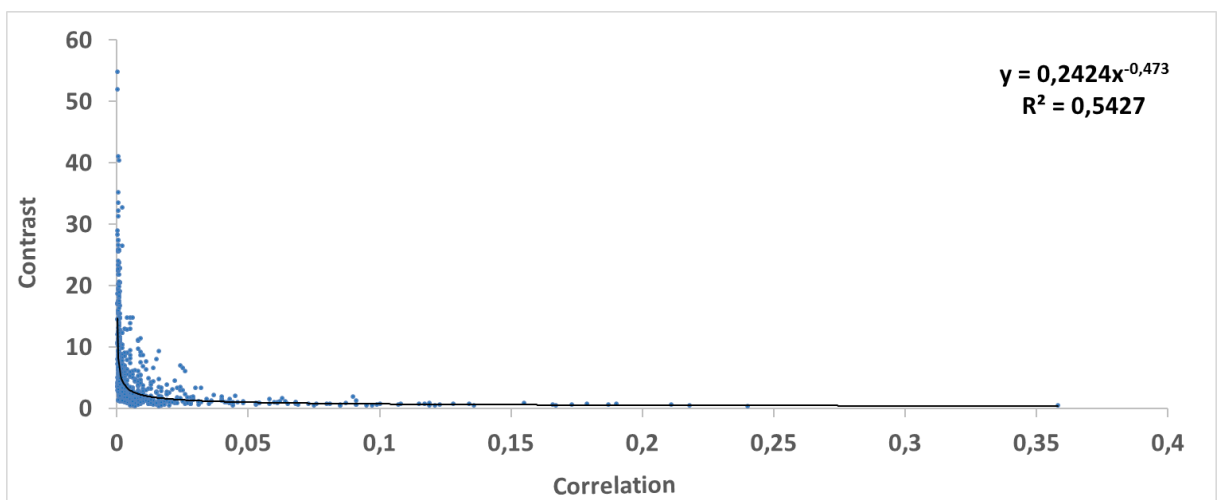
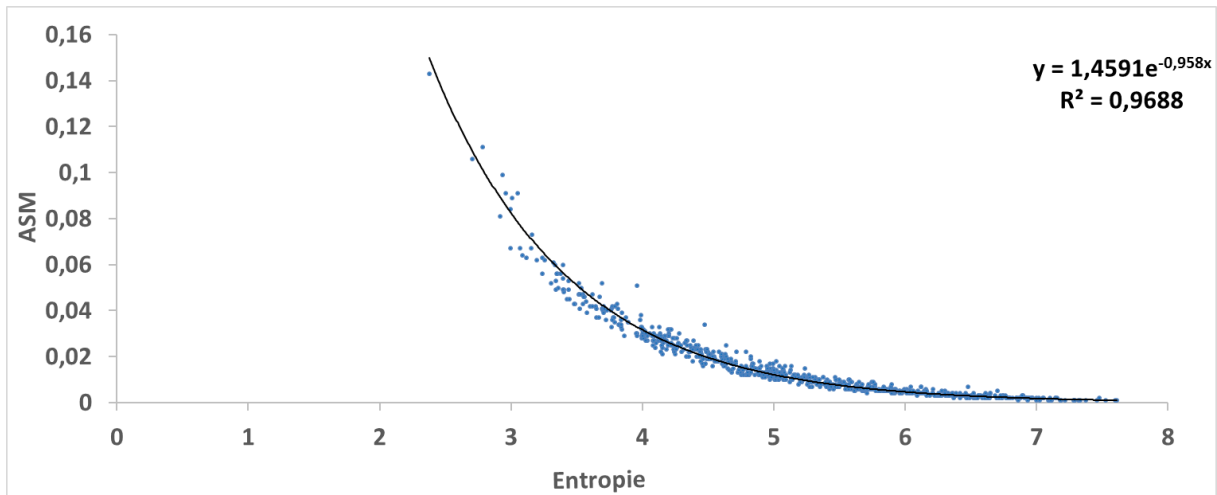


Abb. 66: Punktwolken-Diagramm von ASM und Entropie (oben), Contrast und Correlation (mittig) und Contrast und IDM (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der **lokal-Kachel-basierten** Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

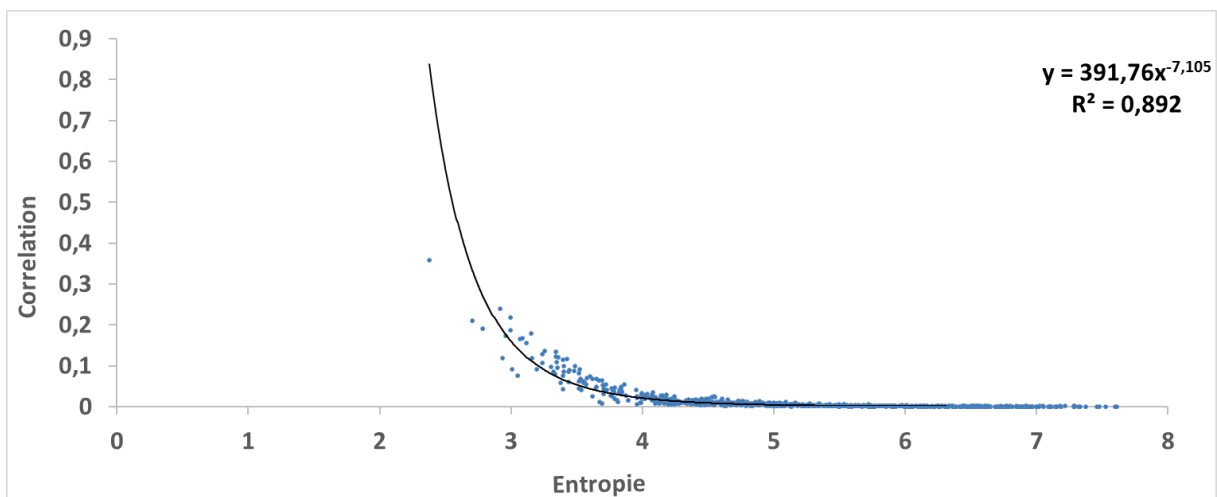
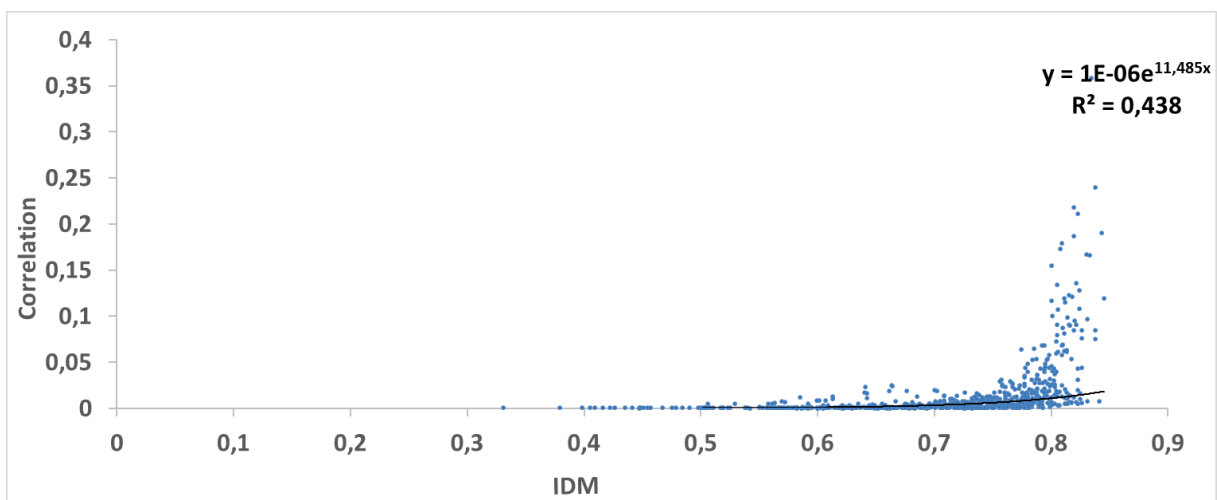
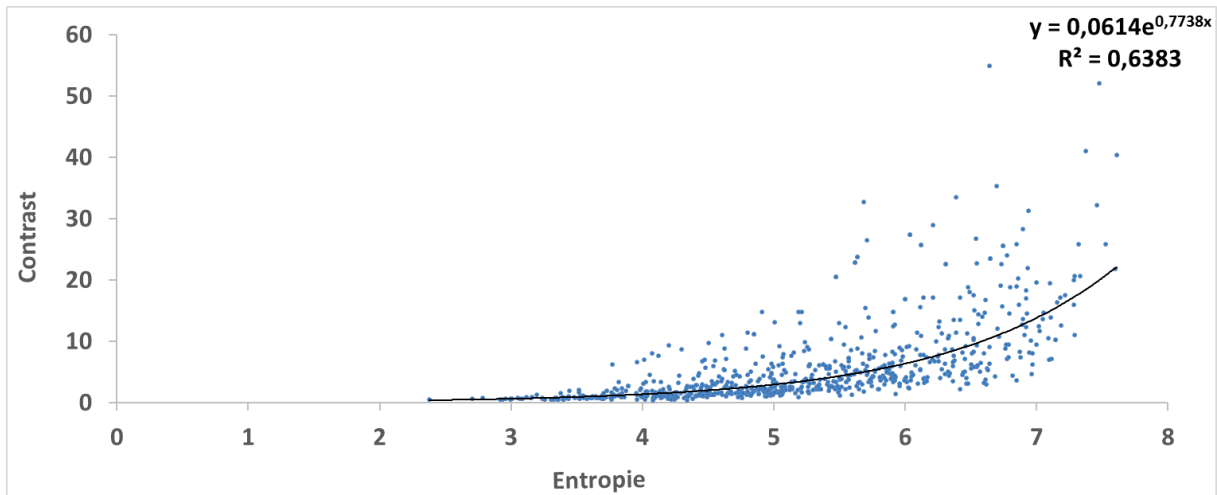


Abb. 67: Punktwolken-Diagramm von Correlation und Entropie (oben), Correlation und IDM (mittig) sowie Correlation und Entropie (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der **lokal-Kachel-basierten** Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

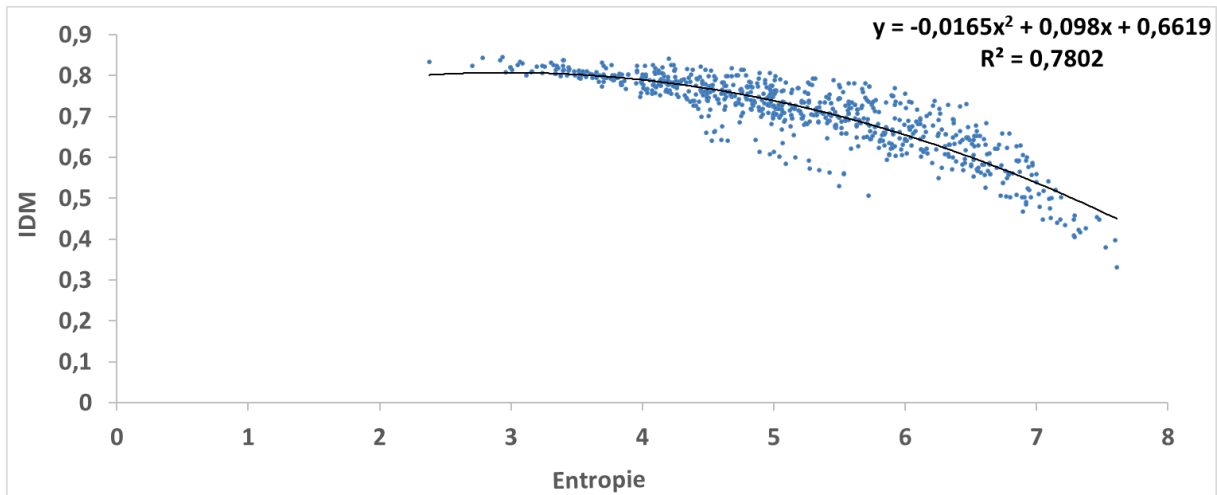
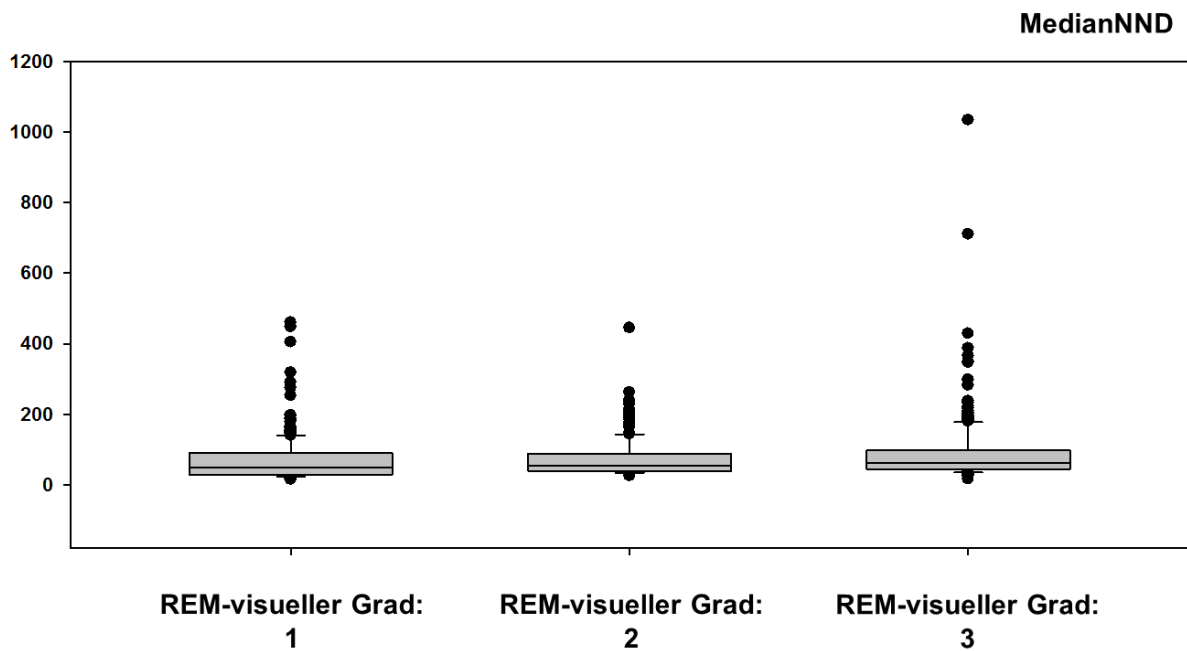


Abb. 68: Punktwolken-Diagramm von IDM und Entropie als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der **lokal-Kachel-basierten** Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

Von diesen zehn dargestellten **lokalen**, Kachel-basierten Korrelationen (von zehn möglichen) zeigten sich alle zehn auch in der **globalen**, Proben-basierten Analyse.

3.6 Ergebnisse und Darstellung signifikanter Unterschiede zwischen quantitativen Parametern der räumlichen Organisation

Im Folgenden werden nun sowohl Proben-basiert (**global**) wie auch Kachel-basiert (**lokal**) die Ergebnisse sowie die Unterschiede und signifikanten Korrelationen zwischen den quantitativen Parametern der räumlichen Organisation graphisch und tabellarisch dargestellt.



MedianNND

	REM- visuell 1	REM- visuell 2	REM- visuell 3
REM-visuell 1	x		
REM-visuell 2		x	
REM-visuell 3			x

Abb. 69: Unterschiede in der **globalen** MedianNND der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab.

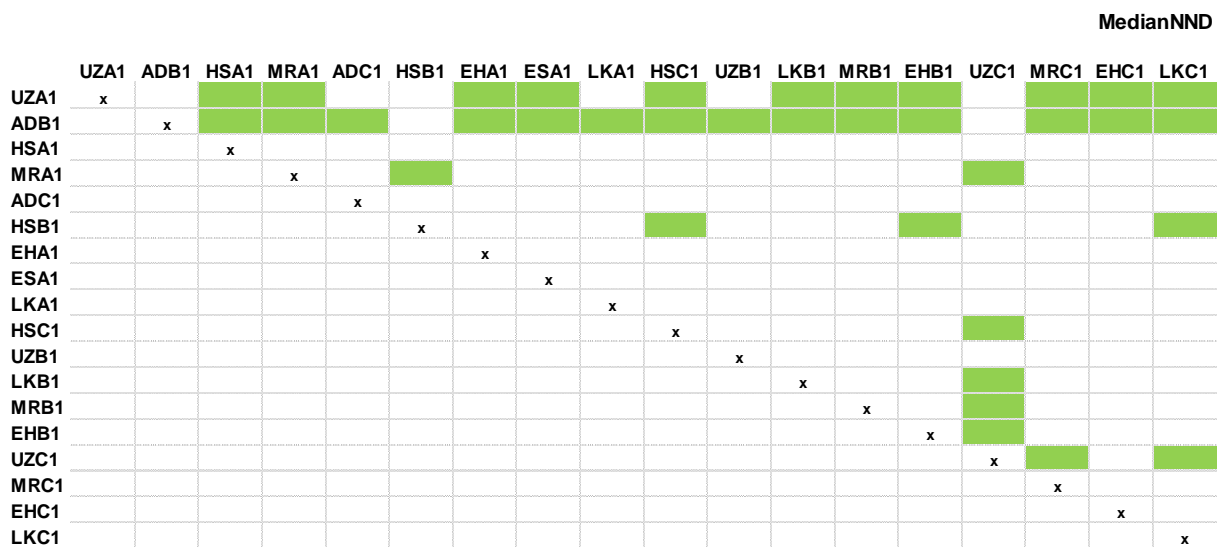
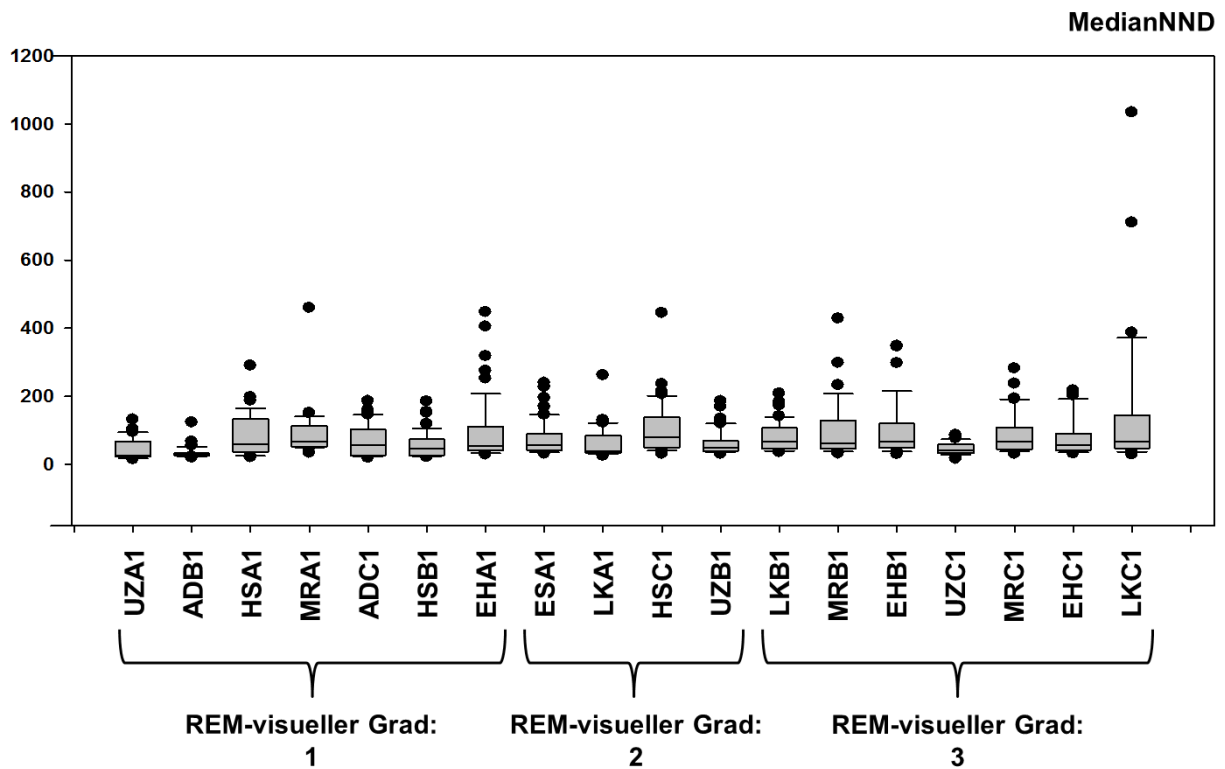
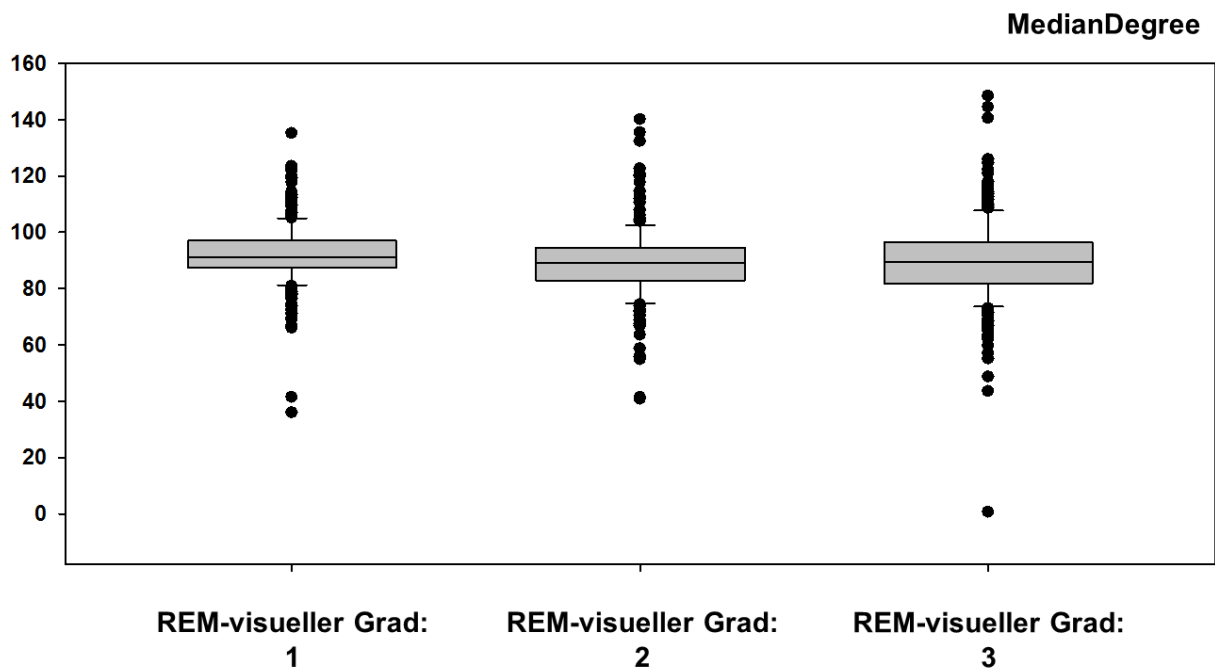


Abb. 70: Unterschiede in der **lokalen** MedianNND der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der isolieren, lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab.



	MedianDegree		
	REM-visuell 1	REM-visuell 2	REM-visuell 3
REM-visuell 1	x		
REM-visuell 2		x	
REM-visuell 3			x

Abb. 71: Unterschiede im **globalen** MedianDegree der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab.

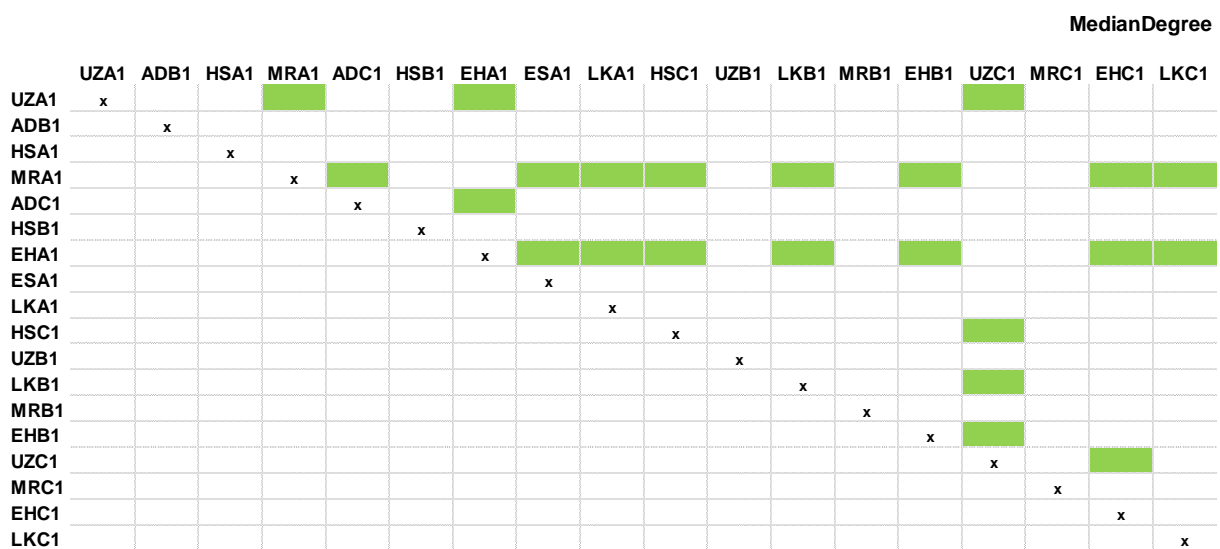
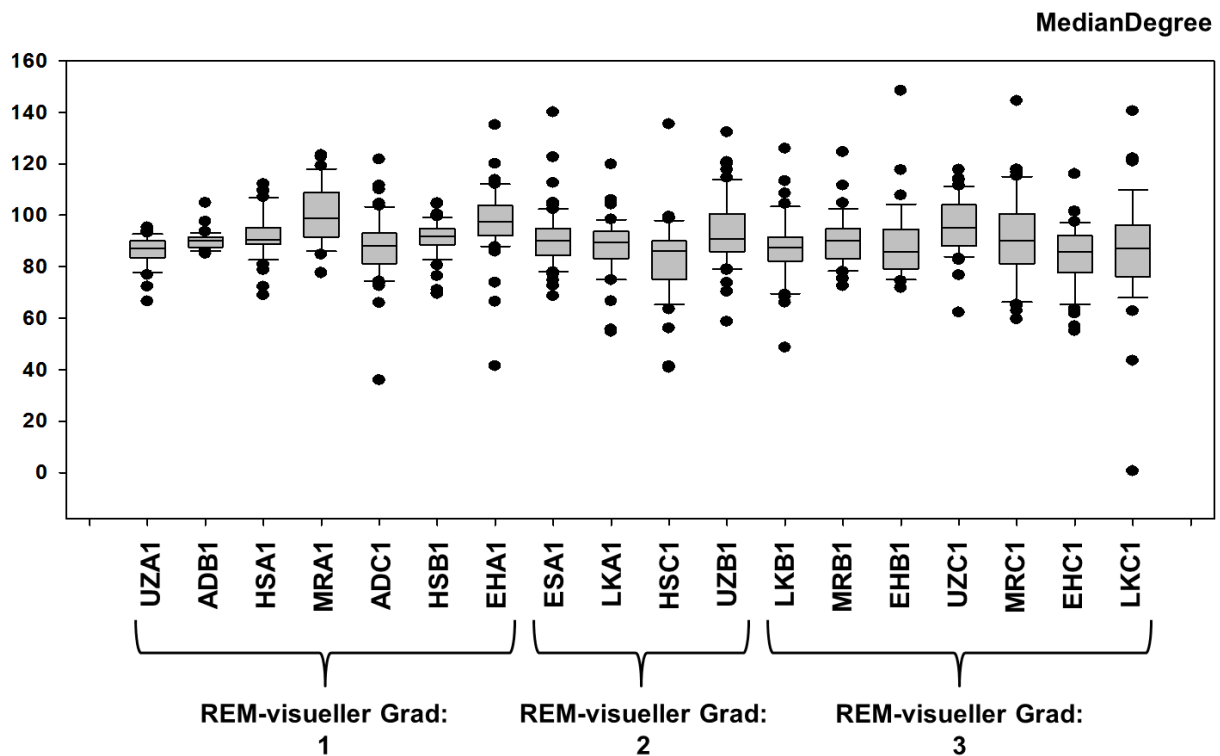
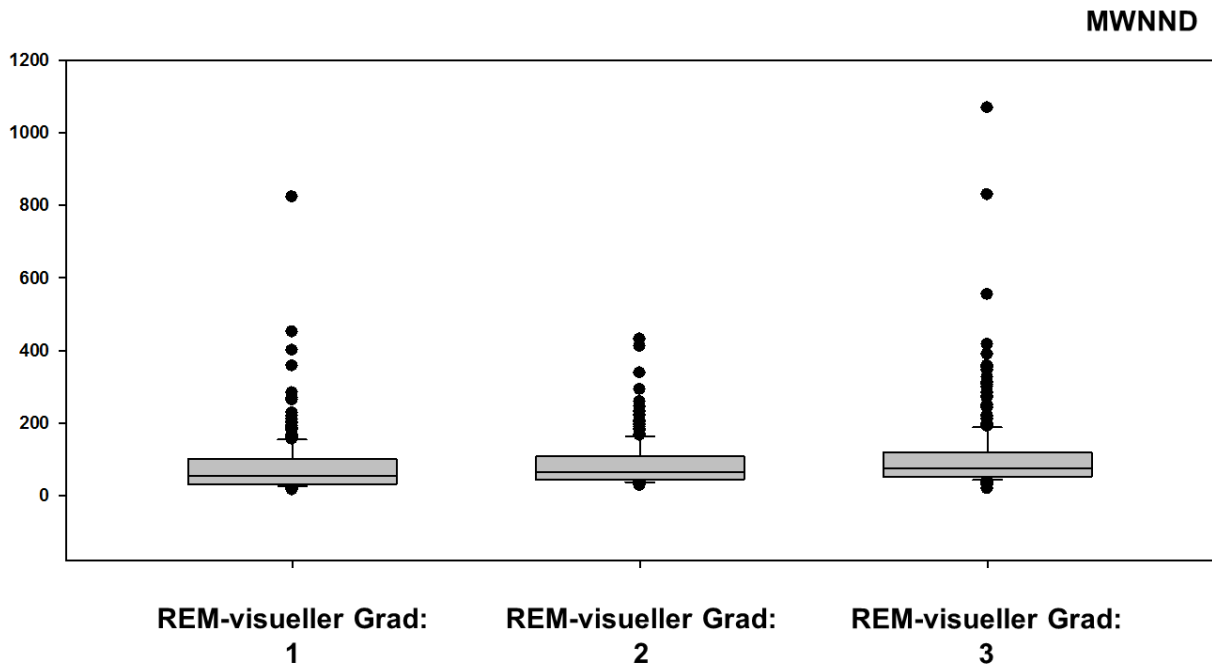


Abb. 72: Unterschiede im **lokalen** MedianDegree der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der isolieren, lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab.



MWNND

	REM-visuell 1	REM-visuell 2	REM-visuell 3
REM-visuell 1	x		
REM-visuell 2		x	
REM-visuell 3			x

Abb. 73: Unterschiede im **globalen** MWNND der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab.

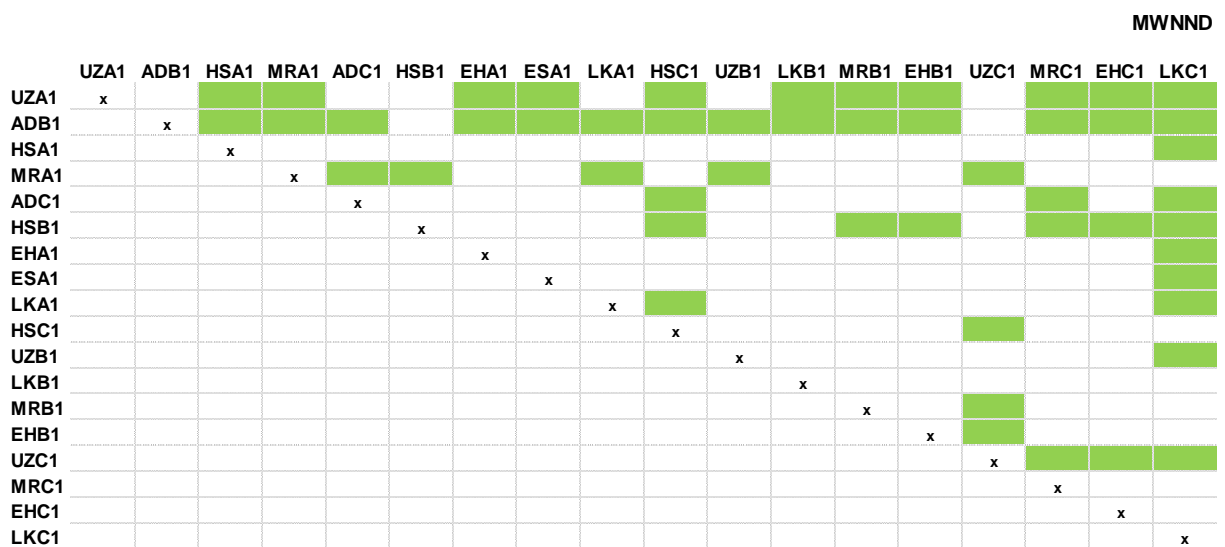
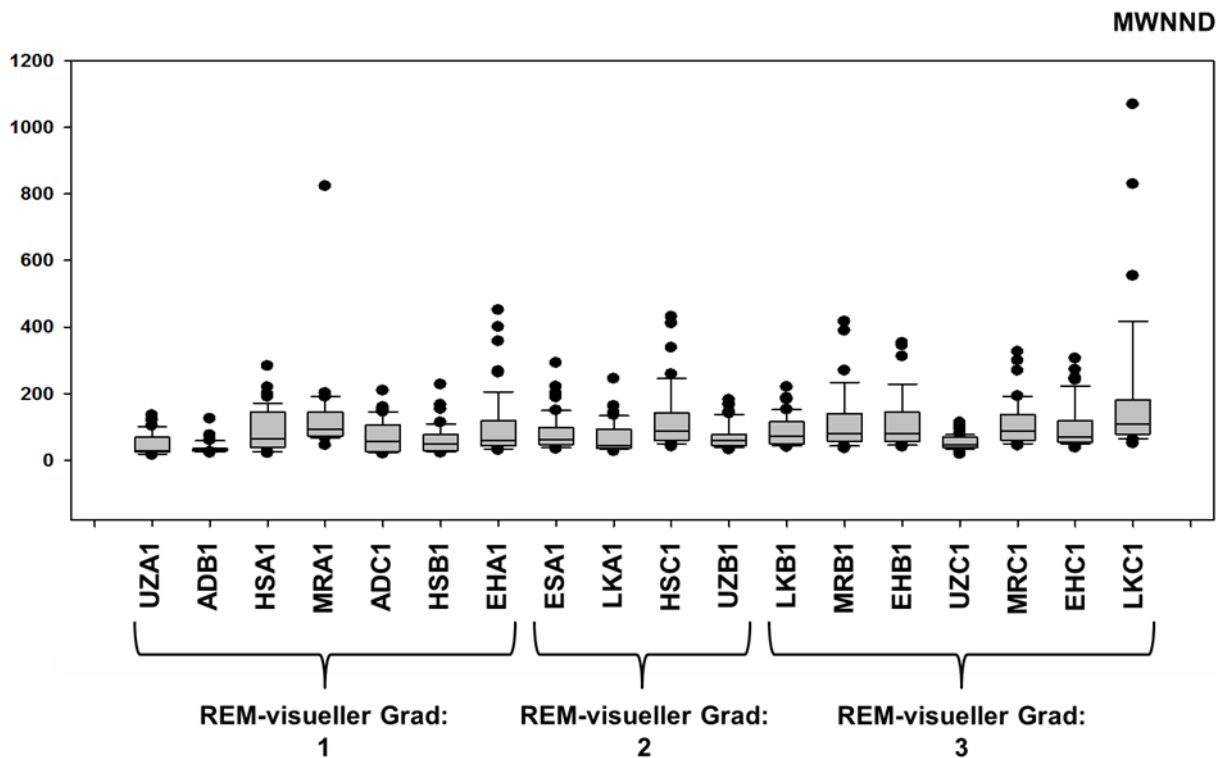
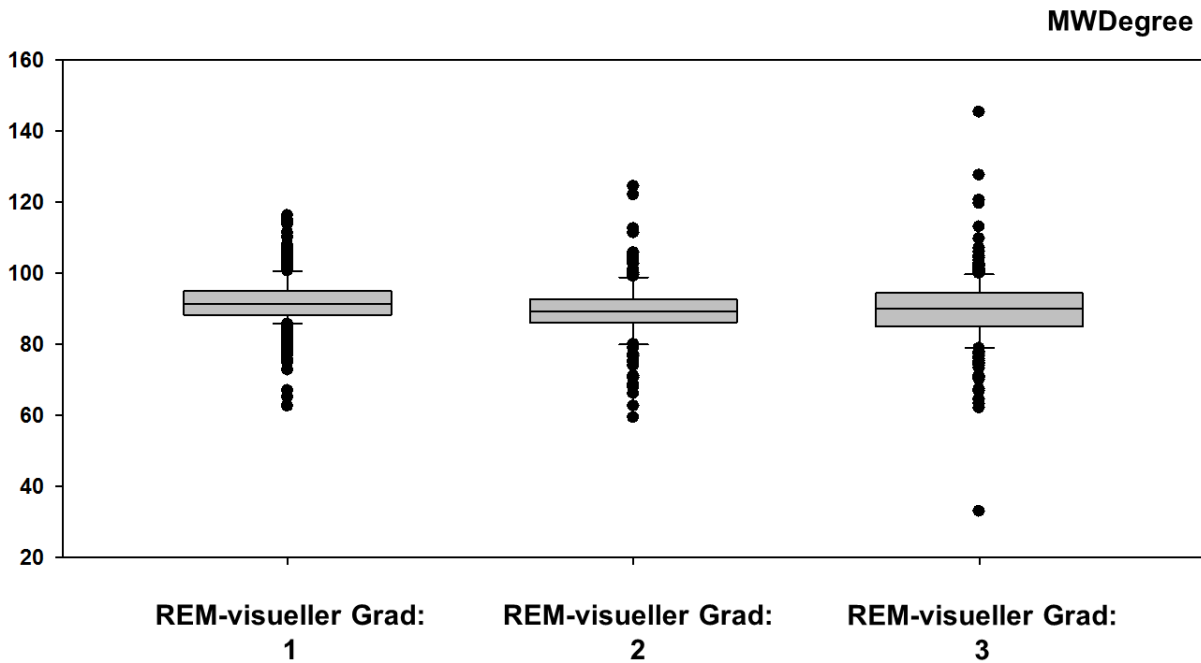


Abb. 74: Unterschiede im **lokalen** MWNND der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der isolieren, lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab.



MWDegree

	REM- visuell 1	REM- visuell 2	REM- visuell 3
REM- visuell 1	x		
REM- visuell 2		x	
REM- visuell 3			x

Abb. 75: Unterschiede im **globalen** MWDegree der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab.

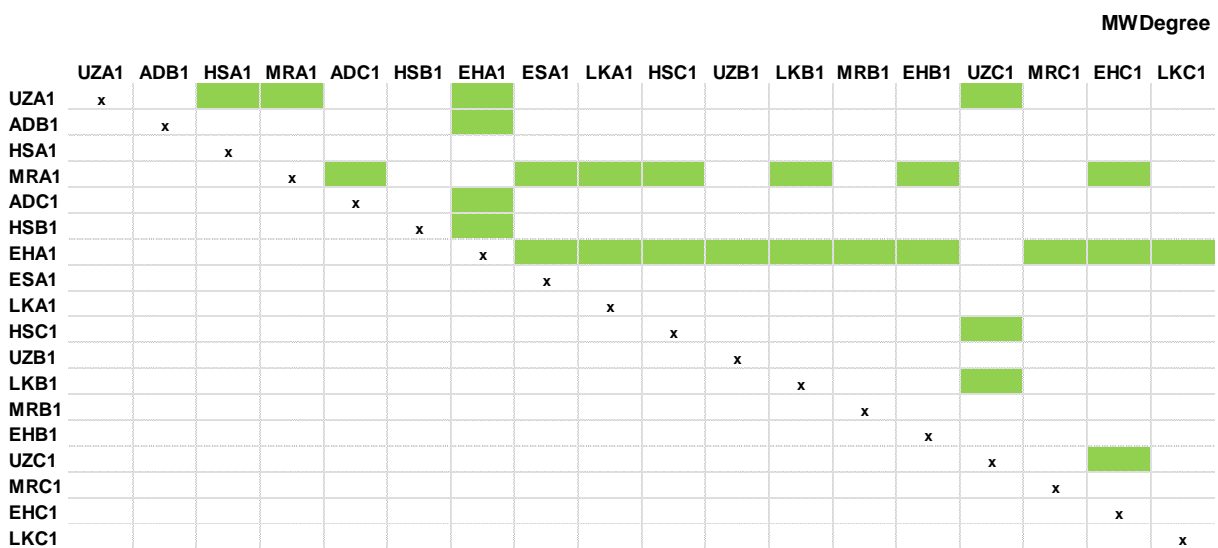
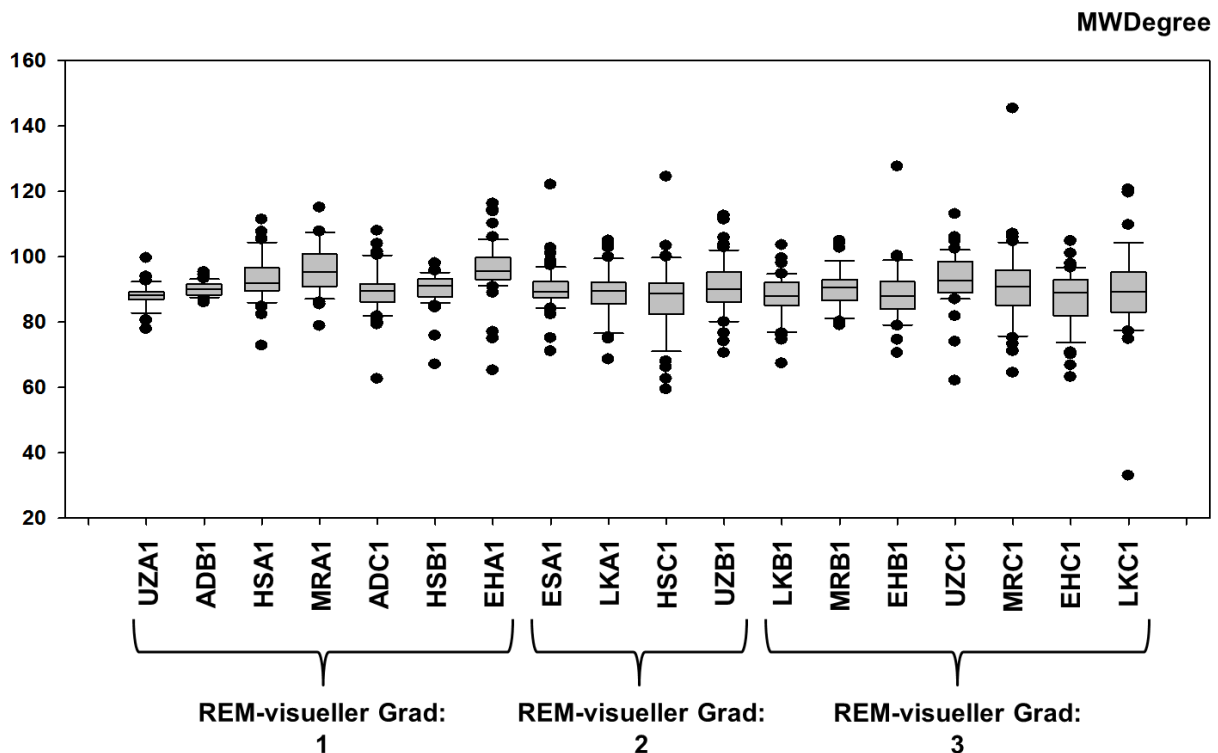
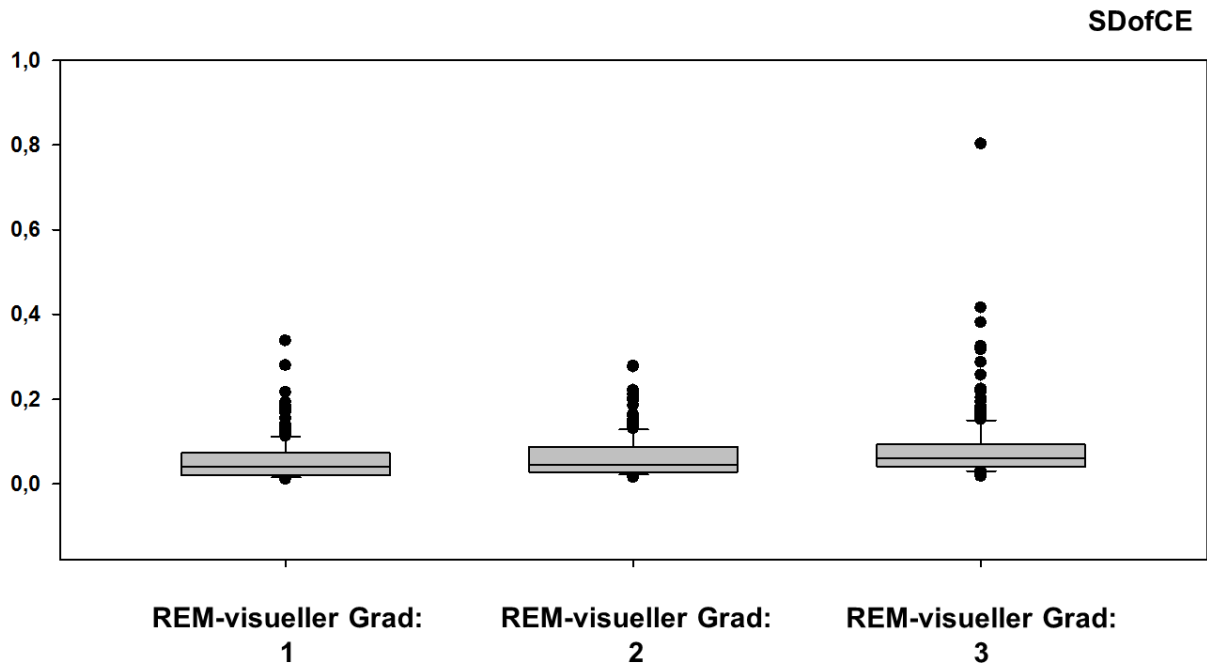


Abb. 76: Unterschiede im **lokalen** MWDegree der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der isolieren, lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab.



	SDofCE		
	REM- visuell 1	REM- visuell 2	REM- visuell 3
REM-visuell 1	x		
REM-visuell 2		x	
REM-visuell 3			x

Abb. 77: Unterschiede in der **globalen** Standard Deviance of Clark-Evans (SDofCE) der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab.

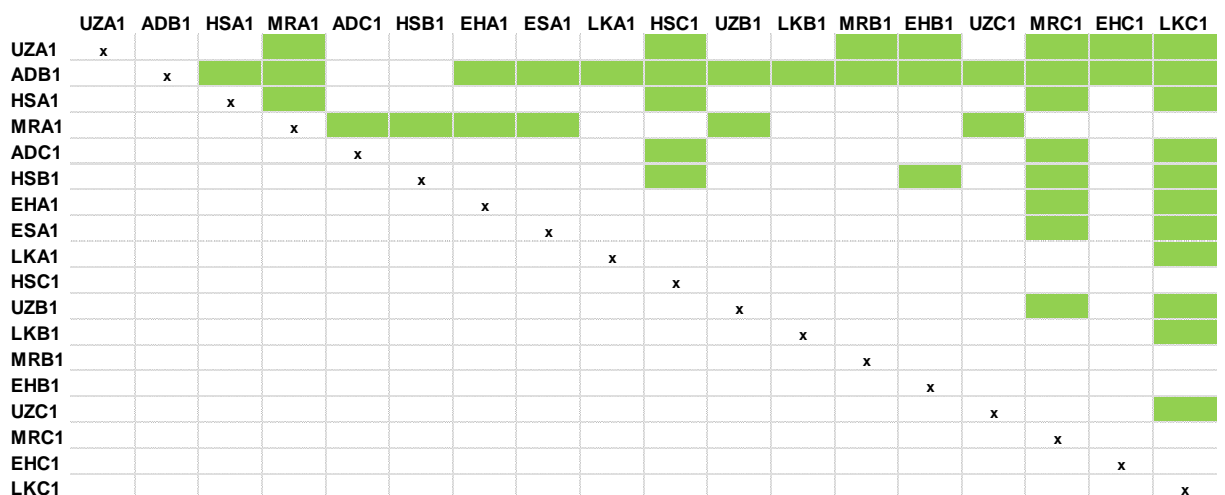
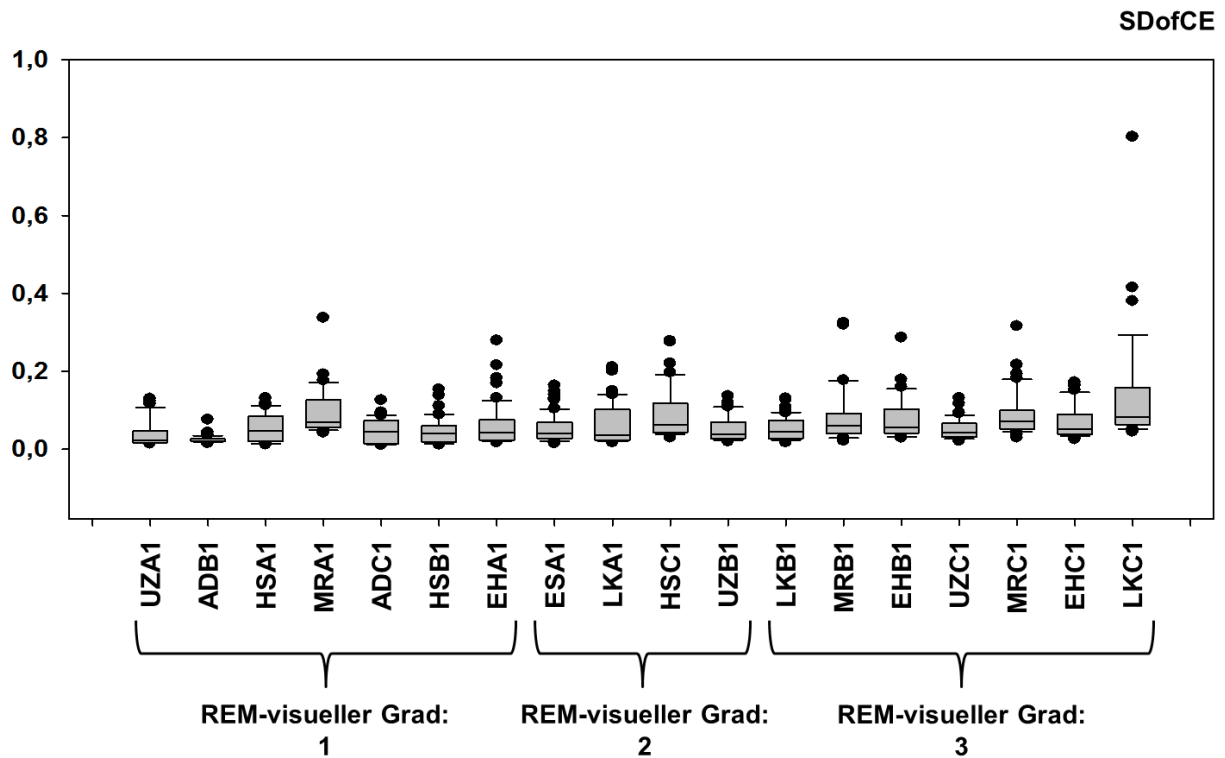
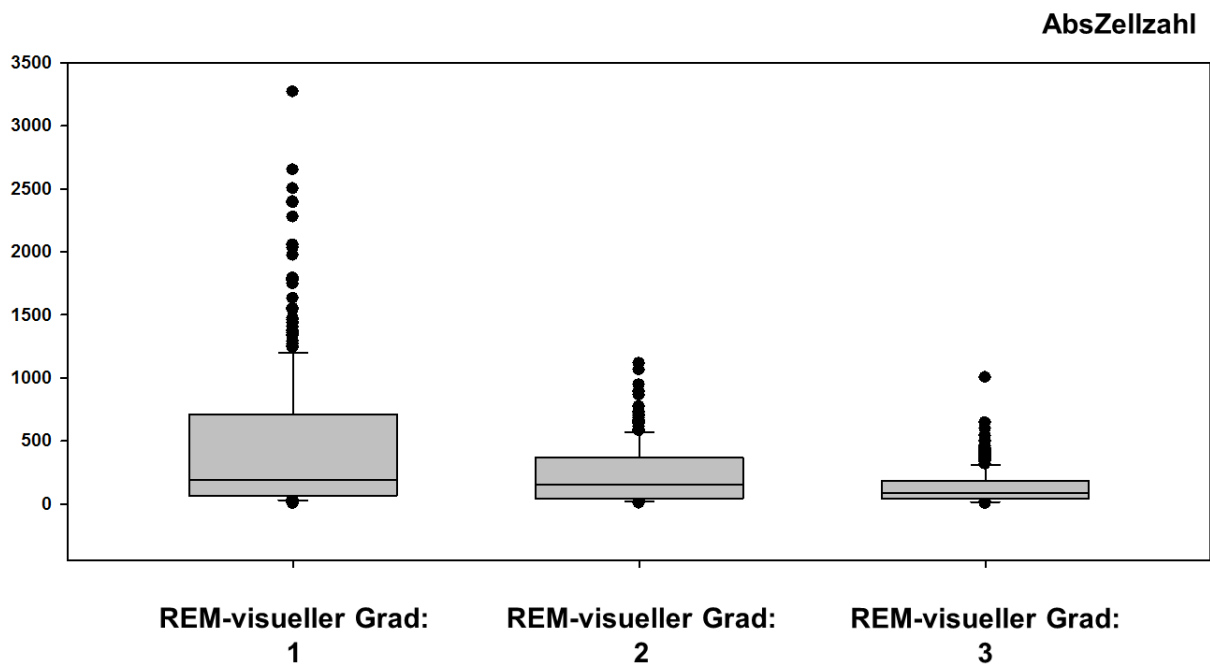


Abb. 78: Unterschiede in der **lokalen** Standard Deviance of Clark-Evens (SDofCE) der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der isolieren, lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab.



	AbsZellzahl		
	REM- visuell 1	REM- visuell 2	REM- visuell 3
REM-visuell 1	x		
REM-visuell 2		x	
REM-visuell 3			x

Abb. 79: Unterschiede in der **globalen** absoluten Zellzahl der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab.

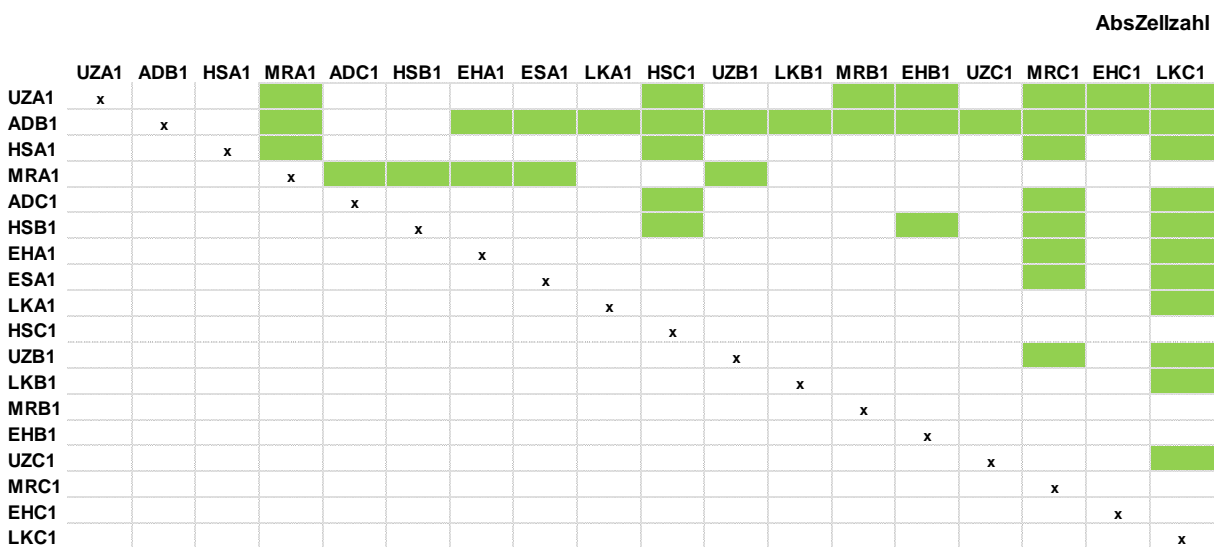
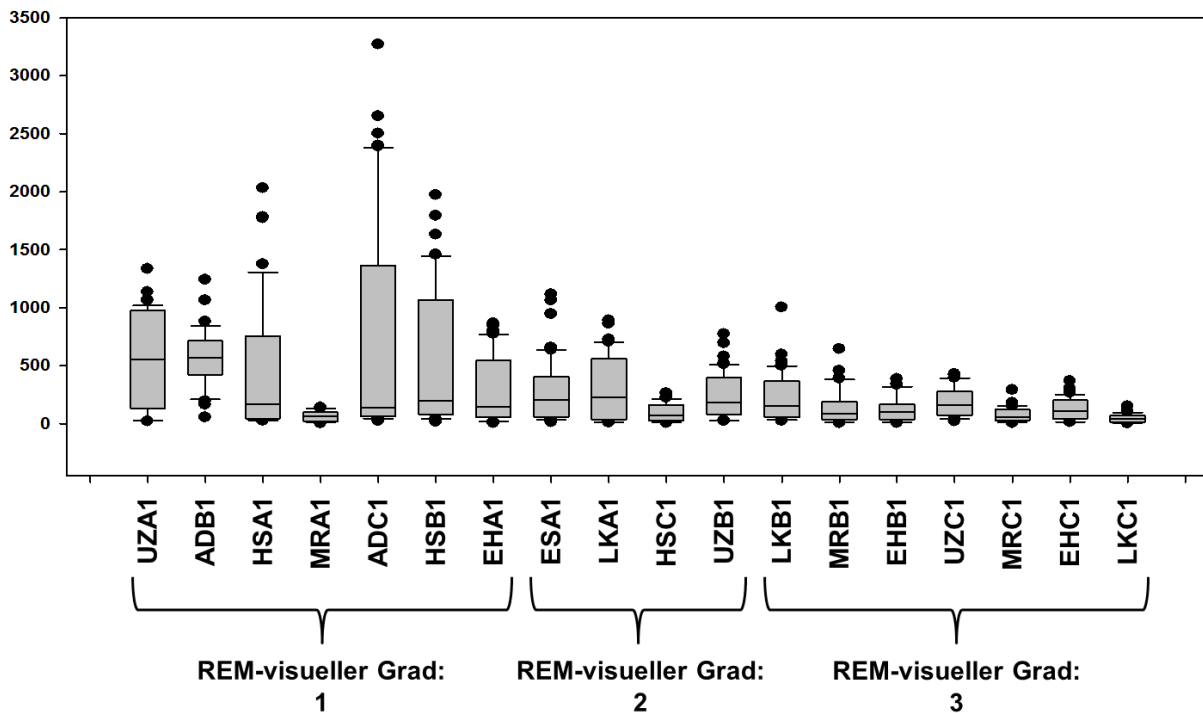
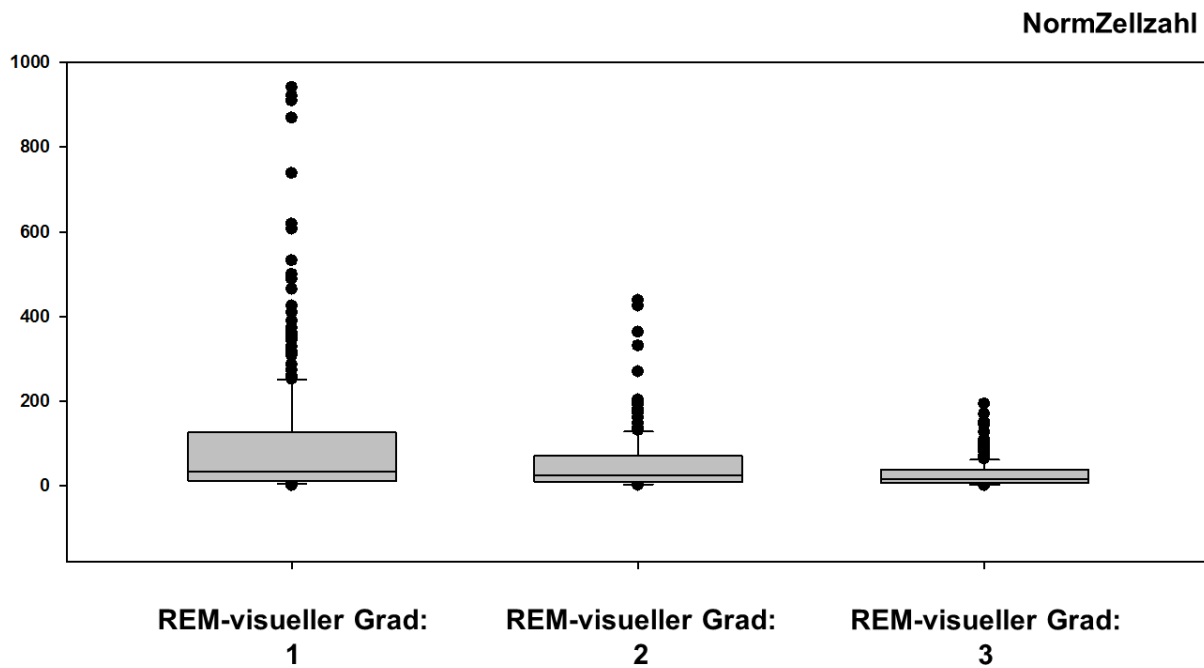


Abb. 80: Unterschiede in der **lokalen** absoluten Zellzahl der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der isolieren, lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab.



	NormZellzahl		
	REM- visuell 1	REM- visuell 2	REM- visuell 3
REM-visuell 1	x		
REM-visuell 2		x	
REM-visuell 3			x

Abb. 81: Unterschiede in der **globalen** normierten Zellzahl der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab.

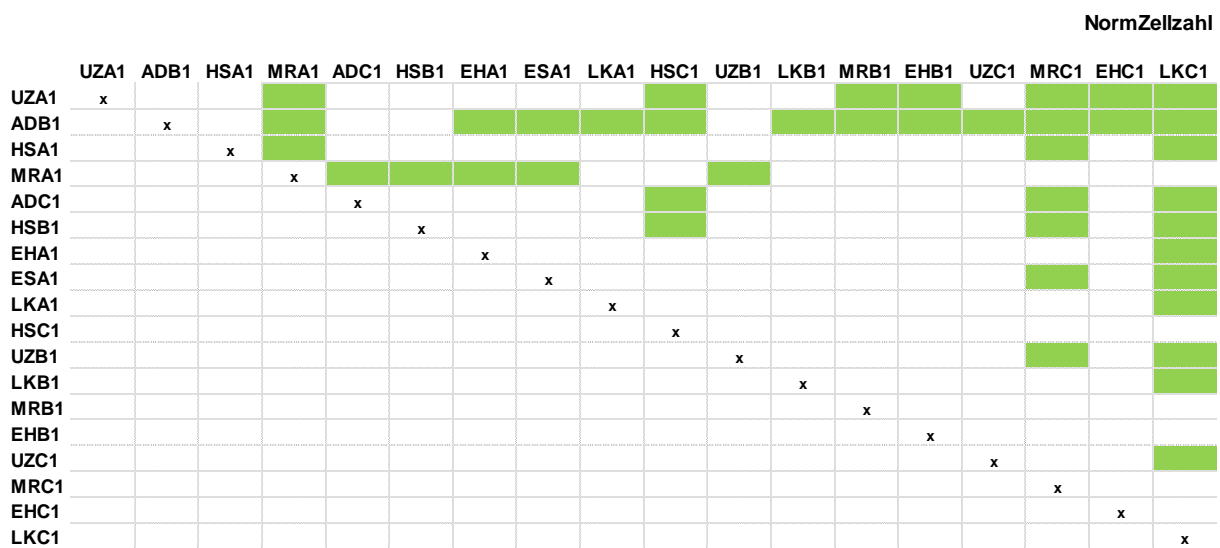
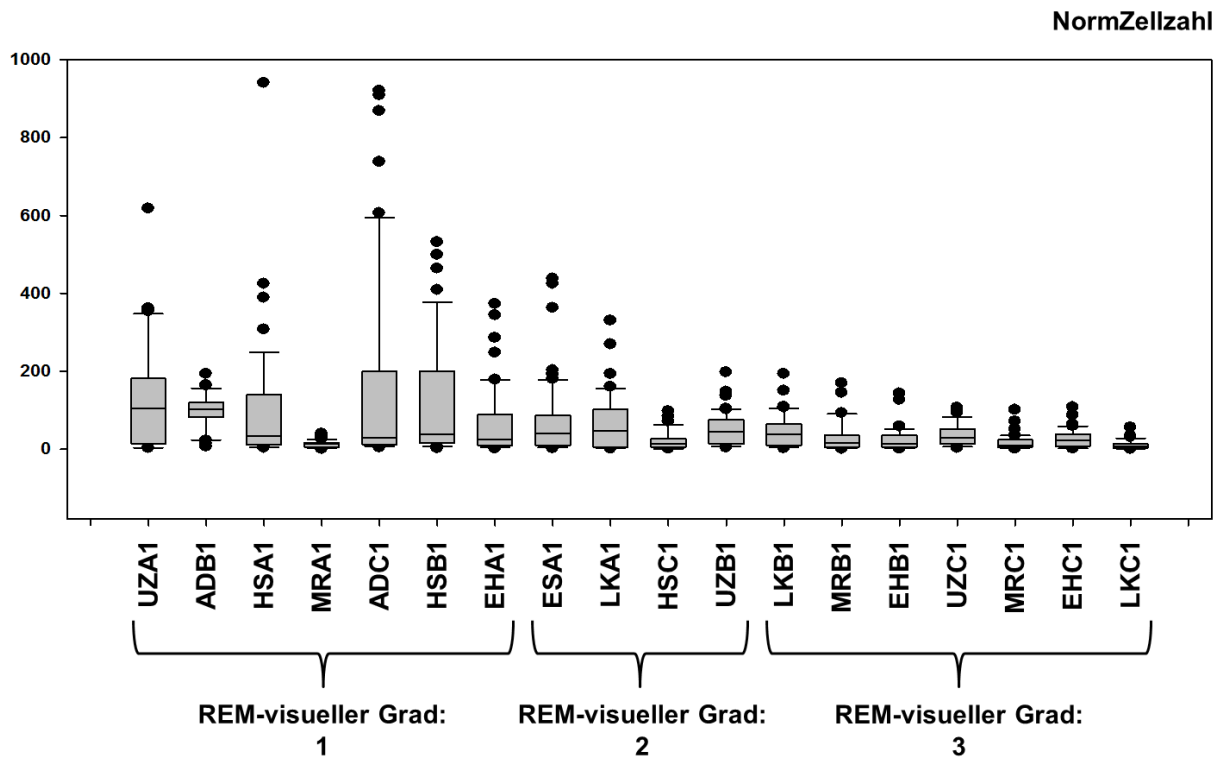
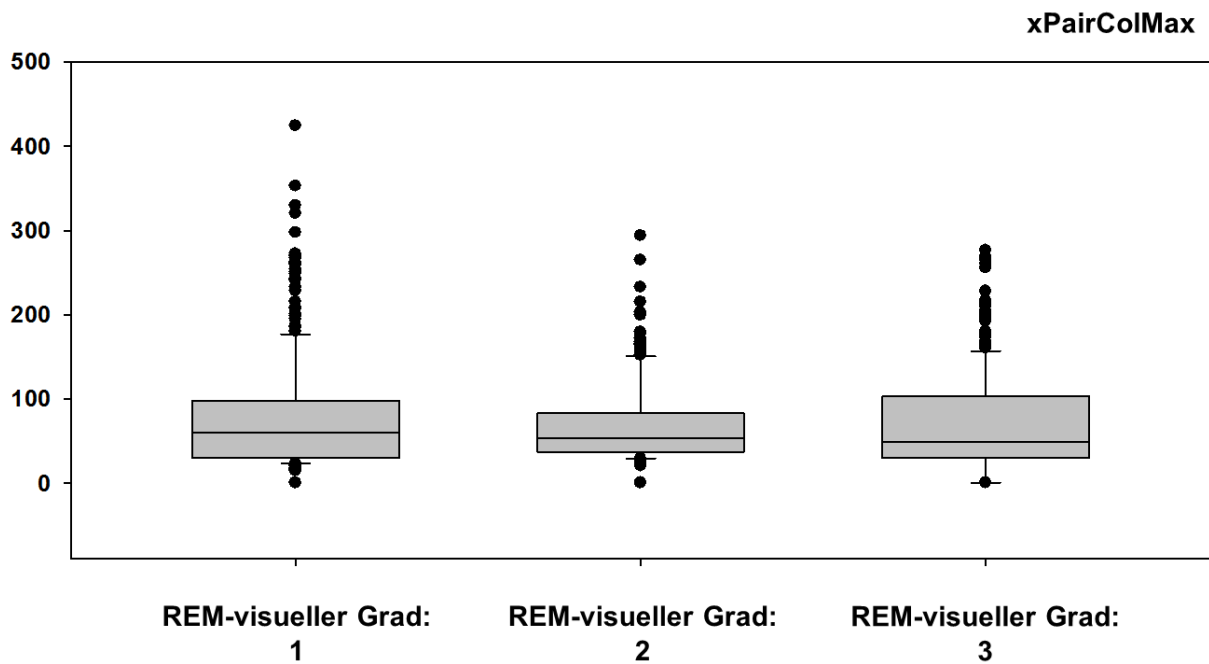


Abb. 82: Unterschiede in der **lokalen** normierten Zellzahl der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der isolieren, lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab.



xPairColMax

	REM- visuell 1	REM- visuell 2	REM- visuell 3
REM- visuell 1	x		
REM- visuell 2		x	
REM- visuell 3			x

kein statistisch signifikanter Unterschied

Abb. 83: Unterschiede im **globalen** xPairColMax der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab.

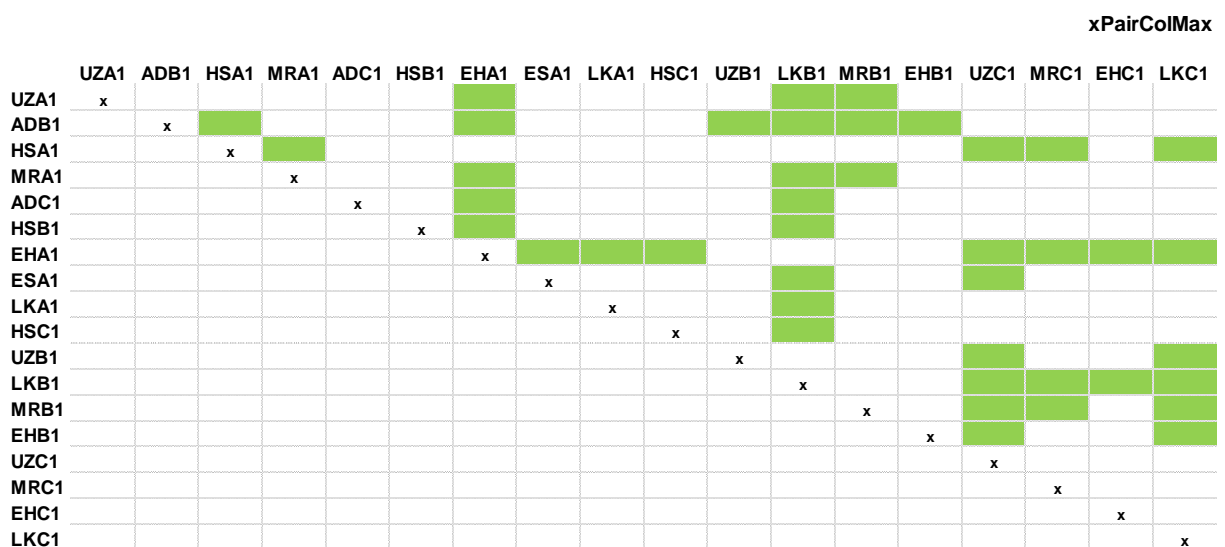
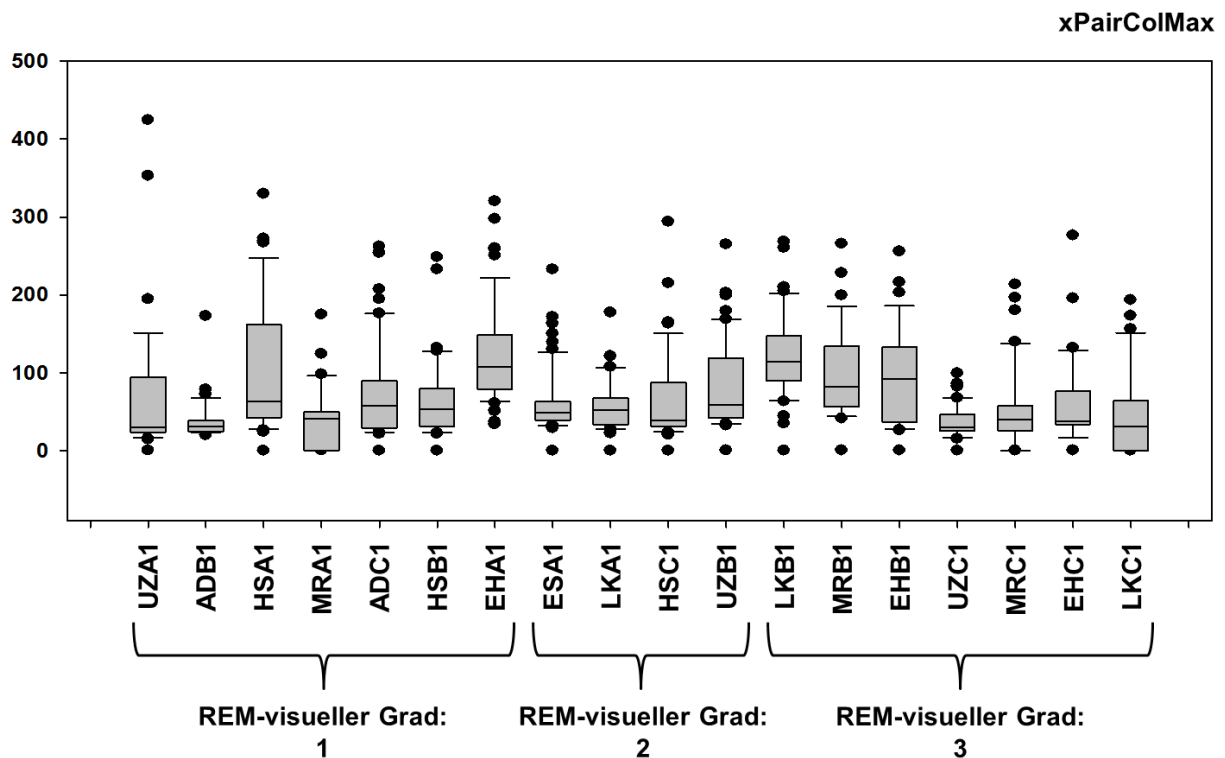
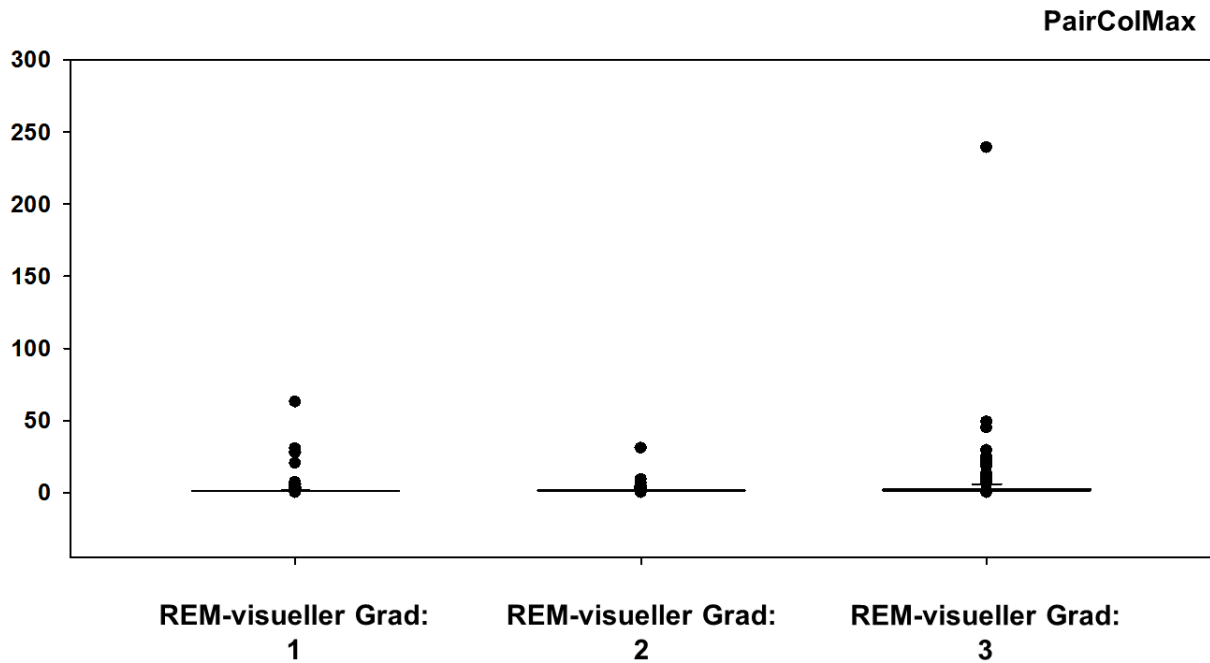


Abb. 84: Unterschiede im **lokalen** xPairColMax der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der isolieren, lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab.



PairColMax

	REM-visuell 1	REM-visuell 2	REM-visuell 3
REM-visuell 1	x		
REM-visuell 2		x	
REM-visuell 3			x

Abb. 85: Unterschiede im **globalen** PairColMax der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab.

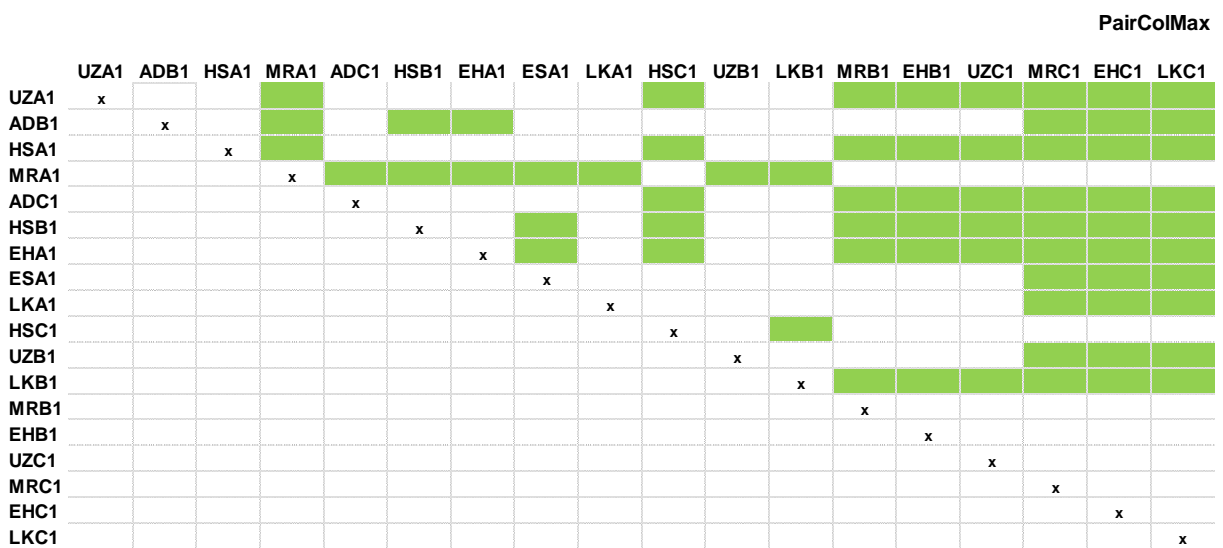
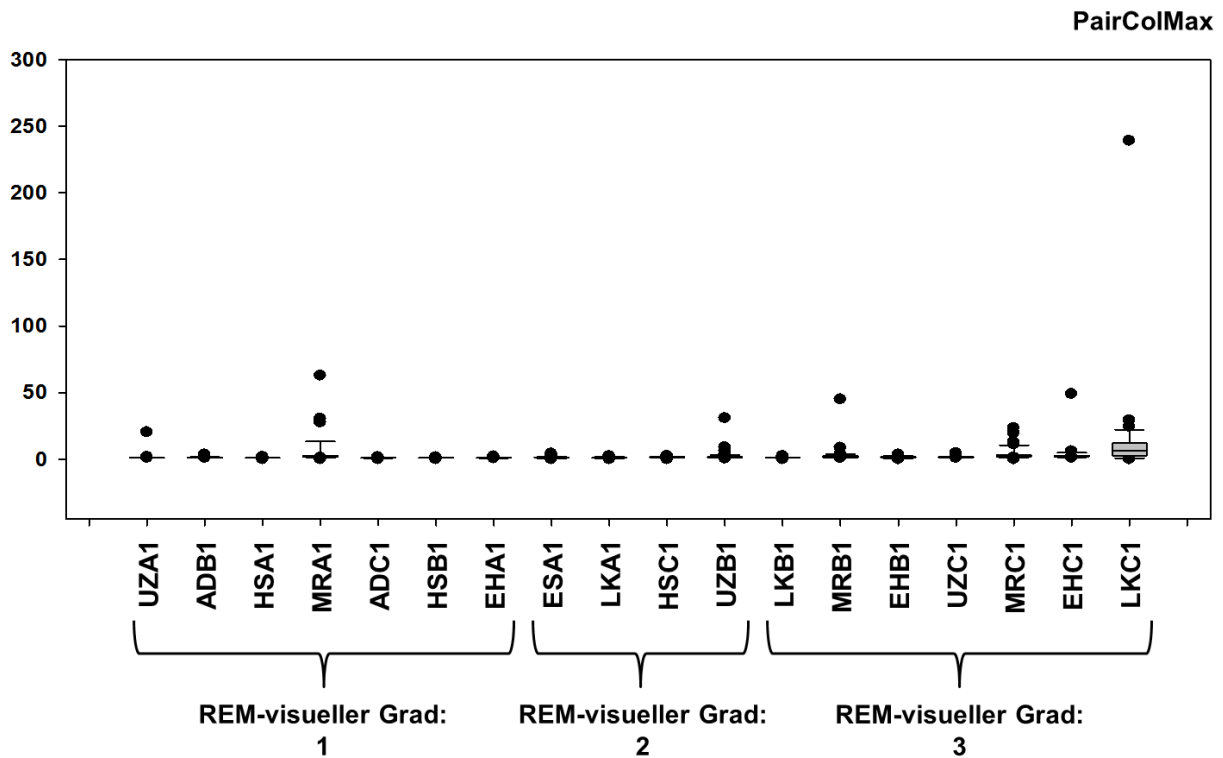
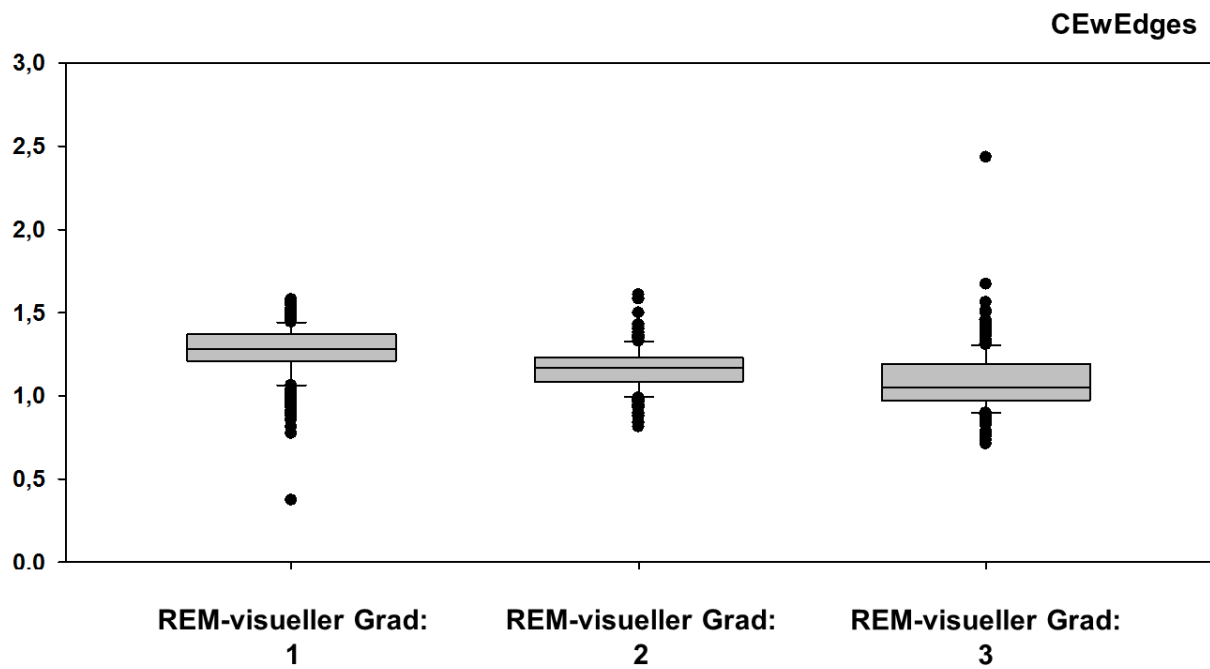


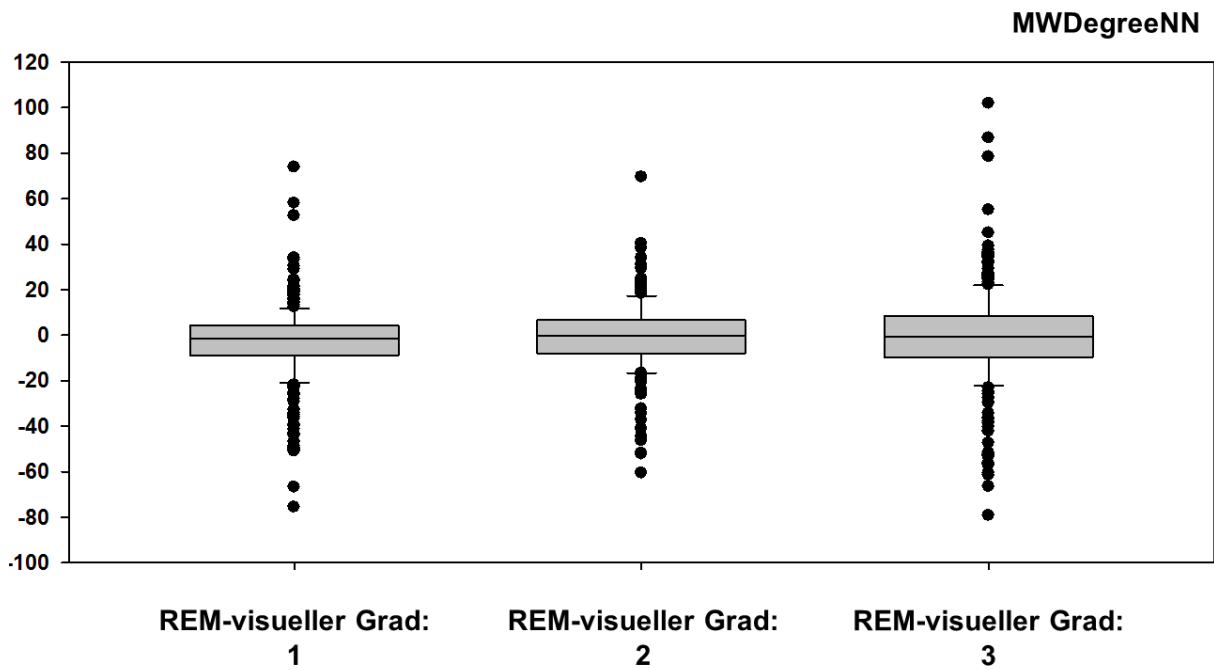
Abb. 86: Unterschiede im **lokalen** PairColMax der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der isolieren, lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab.



CEwEdges

	REM- visuell 1	REM- visuell 2	REM- visuell 3
REM-visuell 1	x		
REM-visuell 2		x	
REM-visuell 3			x

Abb. 87: Unterschiede im **globalen** Clark-Evans-Index with Edges (CEwEdges) der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab.



MWDegreeNN

	REM-visuell 1	REM-visuell 2	REM-visuell 3
REM-visuell 1	x		
REM-visuell 2		x	
REM-visuell 3			x

kein statistisch signifikanter Unterschied

Abb. 89: Unterschiede im **globalen** MWDegreeNN der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab.

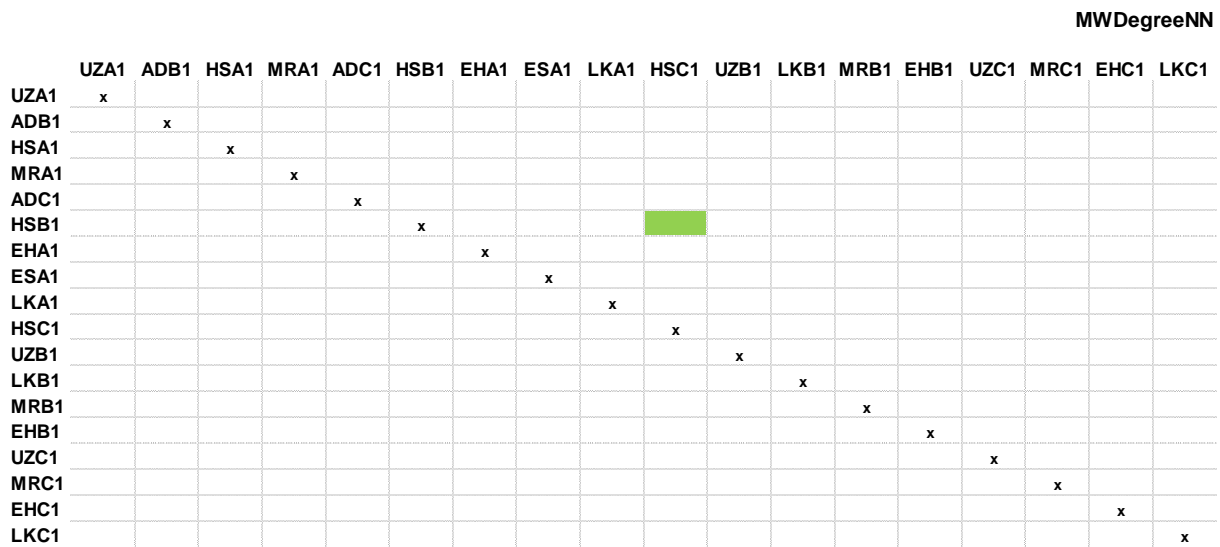
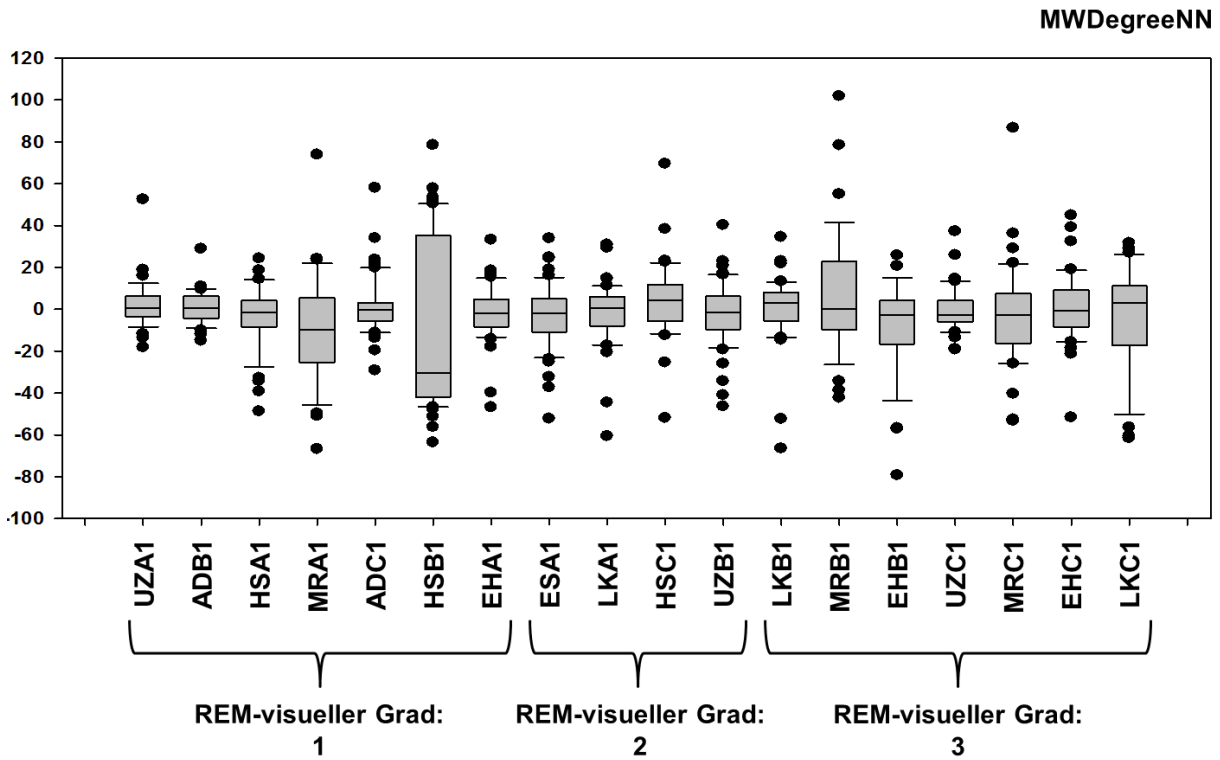
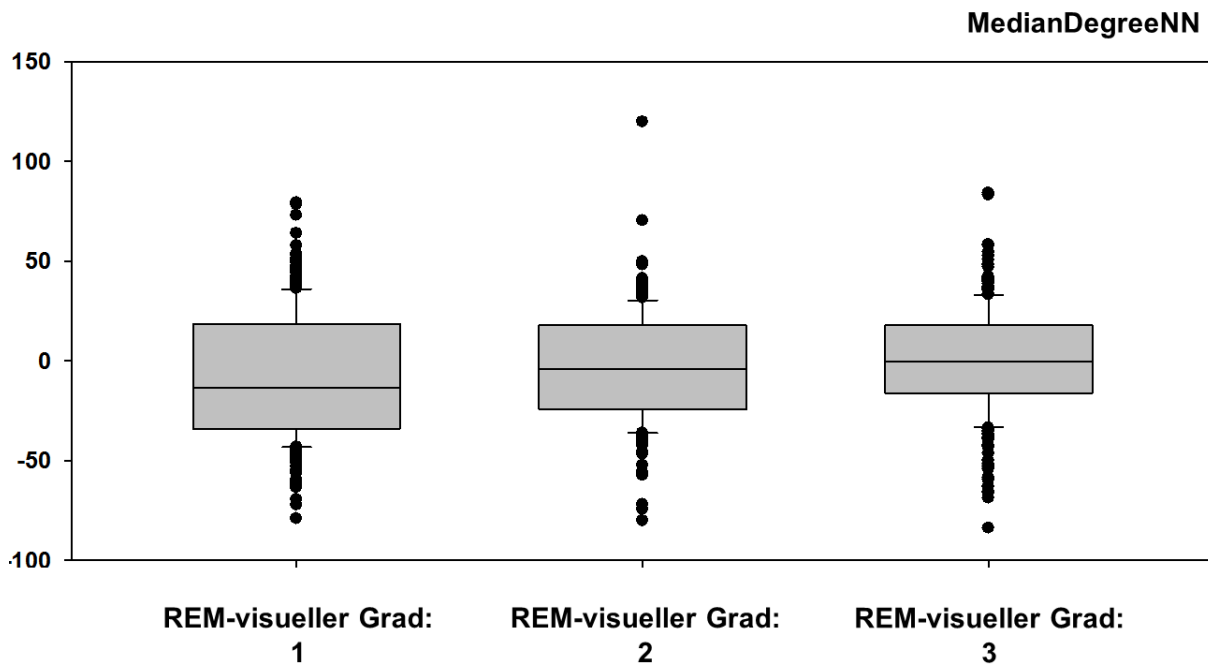


Abb. 90: Unterschiede im **lokalen** MWDegreeNN der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der isolieren, lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab.



MedianDegreeNN

	REM- visuell 1	REM- visuell 2	REM- visuell 3
REM-visuell 1	x		
REM-visuell 2		x	
REM-visuell 3			x

Abb. 91: Unterschiede im **globalen** MedianDegreeNN der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der gesamten Probenoberfläche in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab.

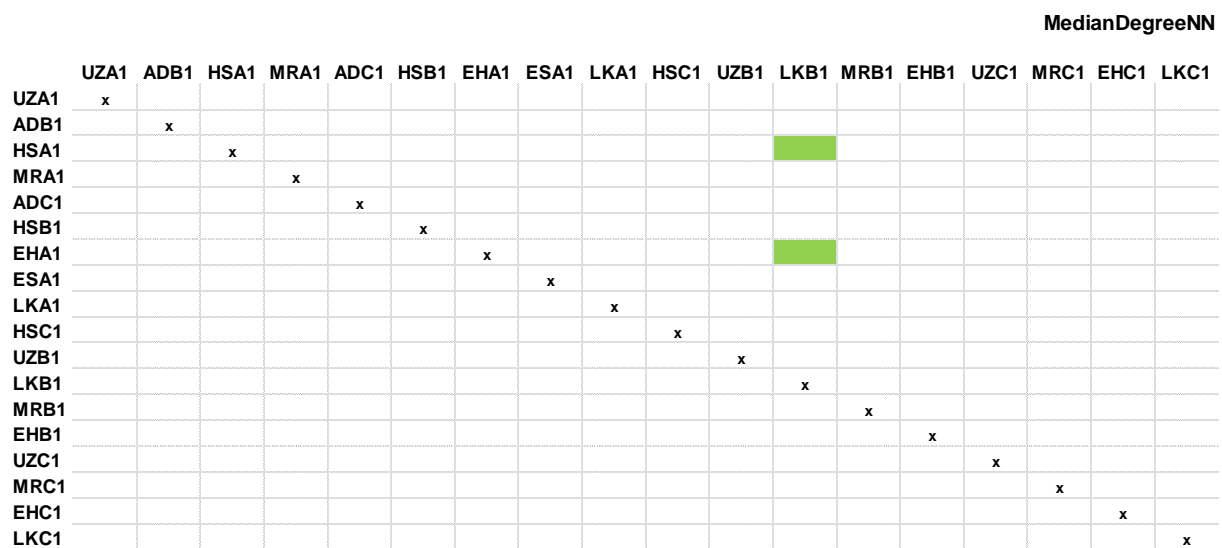
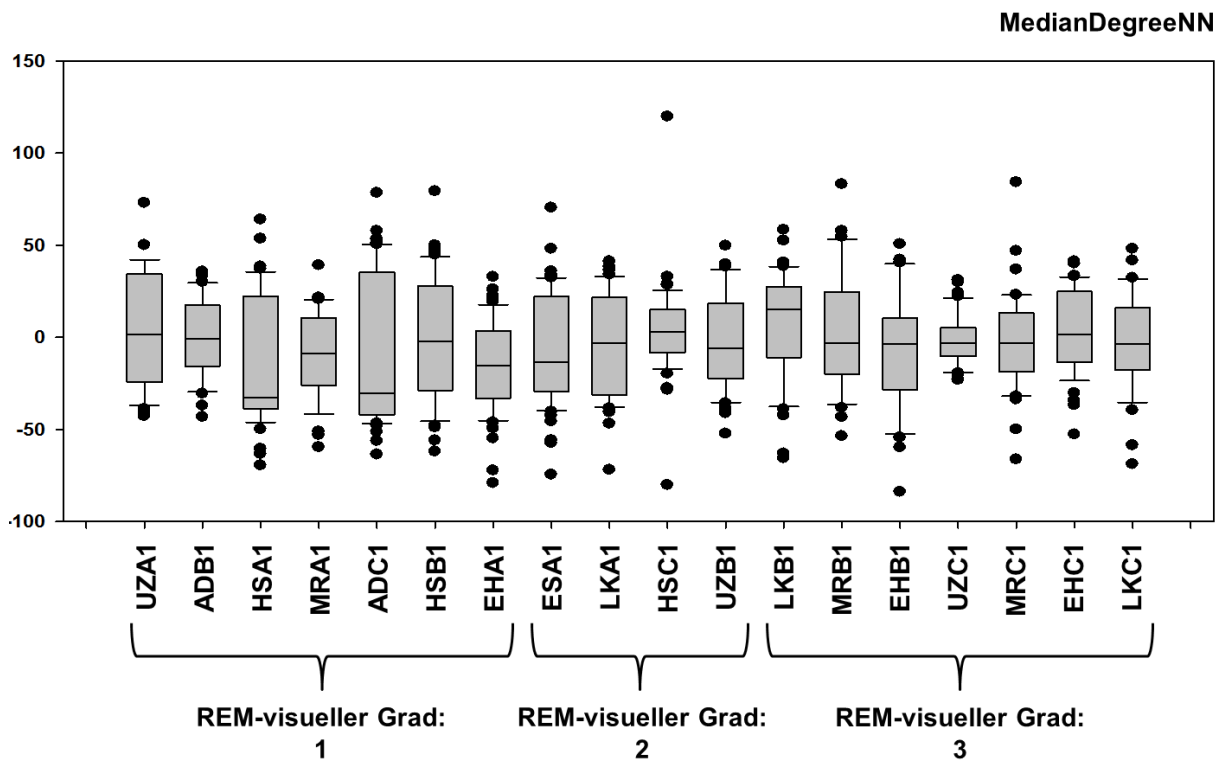


Abb. 92: Unterschiede im **lokalen** MedianDegreeNN der analysierten fluoreszenz-mikroskopischen-Aufnahmen der isolieren, lokalen Probenoberflächen-Kacheln in Abhängigkeit der **globalen** visuellen REM-Klassifikation. Diese Abb. zeigt im oberen Anteil der Abbildung Unterschiede im jeweils rechts oben angegebenen Messparameter und im unteren Anteil grün-farbkodiert signifikante Unterschiede zwischen den Klassifikationsgraden. Die Boxplots zeigen den Median, die 25. und 75. Perzentile sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10. und 90. Perzentile sowie Datenpunkte außerhalb der 10. oder 90. Perzentile. Die Signifikanztabelle zeigt grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab.

Die oben dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Kategorisierung der Proben nach ihrer globalen REM-visuellen Einteilung zu signifikanten Unterschieden bei 10 von 12 erhobenen Messparametern der quantitativen Analyse der räumlichen Organisation führten. Nur die fluoreszenzmikroskopisch erhobenen xPairColMax- und die MWDegreeNN-Messwerte zeigten keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit ihrer globalen REM-visuellen Einteilung, während die anderen 10 Messparameter signifikante Unterschiede in Abhängigkeit ihrer globalen REM-visuellen Einteilung zeigten. Anschließend folgte eine detailliertere Analyse, in der die lokalen, kachel-basierten Werte aller Proben berücksichtigt wurden. Bei der lokalen, kachel-basierten Analyse zeigte sich nur beim PairColMax die gesamte Spannbreite aller über alle Proben hinweg erhobenen Messwerte (100%) in einer einzelnen Probe (LKC1, min: 0, max: 239,05). Die kleinste gesamte Datenspannbreite über alle Proben hinweg fand sich beim Parameter MWDegree (77,9%), gefolgt von MWDegreeNN (79,5%) und CEwithEdges (83,9%). Alle anderen Parameter zeigten Abbildungen der gesamten Datenspannweite innerhalb von einer Probe von mindestens 94,6%. Diese Werte zeigen, dass in der lokalen Betrachtung der Knorpeloberfläche durch die quantitativen Analyse der räumlichen Organisation eine hohe lokale Varianz in allen erhobenen Messparametern vorliegt.

Mit dem Ziel die fluoreszenzmikroskopische Analyse der räumlichen Organisation als diagnostisches Kriterium zu verwenden, wurde im Anschluss untersucht, ob statistische Unterschiede in Parametern der räumlichen Organisation zwischen Knorpelproben mit REM-visuellem Grad 1 vs. 2, Grad 1 vs. 3 und Grad 2 vs. 3 bestanden. Detailliert wurden sieben Grad 1 Knorpelproben gegen vier Grad 2 Knorpelproben getestet. Dies ergab 28 mögliche signifikante Unterschiede. Nun wurde für jeden Parametern der räumlichen Organisation ausgezählt, wie viele dieser 28 möglichen Unterschiede eine statistische Signifikanz erreichten. Der Ergebnisse sind der folgenden Tabelle 12 dargestellt.

Quantitativer Messparameter der räumlichen Organisation	REM visueller Grad 1 vs. 2		REM visueller Grad 1 vs. 3		REM visueller Grad 2 vs. 3	
	Anzahl von 28	in %	Anzahl von 49	in %	Anzahl von 28	in %
MedianNND	7	25	15	30,6	1	3,5
MedianDegree	6	21,4	9	18,3	1	3,5
MWNND	10	35,7	22	44,8	4	14,2
MWDegree	7	25	10	20,4	1	3,5
SDofCE	10	35,7	22	44,8	5	17,8
Abs.Zellzahl	10	35,7	21	42,8	5	17,8
Norm.Zellzahl	8	28,5	19	38,7	5	17,8
xPairColMax	4	14,2	16	32,6	6	21,4
PairColMax	10	35,7	34	69,3	10	35,7
CEwEdges	15	53,5	34	69,3	10	35,7
MWDegreeNN	10	35,7	0	0	0	0
MedianDegreeNN	0	0	2	4,0	0	0
Fluoreszenz-mikroskopisch-visuelle Klassifizierung der räumlichen Organisation ("Pattern")	19	67,8	41	83,6	10	35,7

Tab. 12: Darstellung der Anzahl der signifikanten Unterschiede in den quantitativen Parametern der räumlichen Organisation zwischen Graden der REM-visuellem Einteilung.

Die obige Tabelle illustriert, dass mehrere Parameter der räumlichen Organisation signifikant unterschiedlich zwischen Knorpelproben mit einer REM visuellen Schädigung Grad 1 vs. Grad 2 waren. WNNND, SDofCE, abs. Zellzahl, CE withEdges, und MWDegreeNN zeigen (im Vergleich zu den übrigen Parametern) in den meisten statistischen Vergleichen von Knorpelproben signifikante Unterschiede. Für die Vergleiche von Grad 1 vs. 3 und Grad 2 vs. 3 darf auf die Tabelle verwiesen werden.

Vorausgreifend wurde hier auch der fluoreszenzmikroskopische visuelle Score „Pattern“ mit derselben Methode untersucht. Hier zeigte sich, dass dieser in allen Testreihen (Grad 1 vs. 2, Grad 1 vs. 3 und Grad 2 vs. 3) in einer deutlich höheren Anzahl von statistischen Vergleichen von Knorpelproben signifikante Unterschiede aufwies.

3.7 Analyse signifikanter Korrelationen zwischen quantitativen Parametern der räumlichen Organisation

Bei der Korrelations-Analyse der quantitativen Parameter der räumlichen Organisation zeigten sich mehr Korrelationen in der lokalen (Kachel-basierten; 31 von 66 = 47%) als in der globalen (Proben-basierten; 26 von 66 = 39%) Betrachtungsweise.

Proben-basierte, globale Pearson-Product-Correlation	MedianNND	Median Degree	MWNNND	MWDegree	SDofCE	abs.Zellzahl	norm. Zellzahl	xPairCol Max	PairCol Max	CEwEdges	MWDegree NN	Median DegreeNN
		-0,126	0,977	0,0355	0,908	-0,658	-0,62	0,181	0,687	-0,402	-0,276	-0,12
MedianNND		0,62	3,42E-12	0,889	0,000002	0,00299	0,00608	0,472	0,00164	0,0982	0,267	0,635
		18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
MedianDegree			-0,102	0,945	-0,101	-0,0812	-0,101	0,0165	-0,0885	-0,162	-0,584	-0,573
			0,688	3,73E-09	0,689	0,749	0,69	0,948	0,727	0,52	0,0109	0,0128
			18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
MWNNND				0,0479	0,961	-0,721	-0,691	0,00537	0,774	-0,527	-0,267	-0,0562
				0,85	2,33E-10	0,000733	0,00151	0,983	0,000163	0,0245	0,284	0,825
				18	18	18	18	18	18	18	18	18
MWDegrees					0,0213	-0,0704	-0,0849	0,029	0,0163	-0,121	-0,629	-0,704
					0,933	0,781	0,738	0,909	0,949	0,632	0,00513	0,00112
					18	18	18	18	18	18	18	18
SDofCE						-0,763	-0,732	-0,19	0,822	-0,637	-0,207	0,0211
						0,000232	0,000558	0,45	0,0000285	0,00446	0,411	0,934
						18	18	18	18	18	18	18
absolute_Zellzahl							0,988	0,102	-0,483	0,883	0,202	-0,2
							2,59E-14	0,686	0,0423	0,00000125	0,422	0,427
							18	18	18	18	18	18
normierte_Zellzahl								0,132	-0,479	0,899	0,191	-0,217
								0,6	0,0442	0,000000391	0,448	0,387
								18	18	18	18	18
xPairColMax									-0,382	0,423	-0,107	-0,151
									0,118	0,0805	0,673	0,549
									18	18	18	18
PairColMax										-0,511	-0,163	0,0727
										0,0303	0,519	0,774
										18	18	18
CEwithEdges											0,115	-0,266
											0,648	0,286
											18	18
MWDegreeNN												0,74
												0,000452
												18
MedianDegreeNN												

Tab. 13: Proben-basierte (**globale**) Korrelationsanalyse der untersuchten Fluoreszenz-mikroskopisch erhobenen quantitativen Parameter der räumlichen Organisation. (Obere Zahl: Correlation Coefficient, mittlere Zahl: p-Wert, untere Zahl: Anzahl der Proben; Signifikanz grün markiert bei $p < 0,05$)

Kachel-basierte, lokale Pearson-Product-Correlation	MedianNND	Median Degree	MWNND	MWDegree	SDofCE	abs.Zellzahl	norm. Zellzahl	xPairCol Max	PairCol Max	CEwEdges	MWDegree NN	Median DegreeNN
		-0,0443	0,966	-0,0537	0,898	-0,387	-0,317	0,346	0,0203	0,312	-0,0672	0,00472
MedianNND		0,217	0	0,134	1,05E-279	2,66E-29	1,17E-19	2,04E-23	0,572	4,54E-19	0,0603	0,895
		781	781	781	781	781	781	781	781	781	781	781
MedianDegree			-0,0588	0,865	-0,0385	0,0153	0,0139	0,0208	-0,0079	-0,0266	-0,322	-0,263
			0,1	1,42E-235	0,283	0,67	0,698	0,562	0,826	0,458	2,85E-20	8,67E-14
			781	781	781	781	781	781	781	781	781	781
MWNND				-0,0619	0,922	-0,406	-0,332	0,306	0,0641	0,231	-0,0432	0,0149
				0,0841	4,941E-324	2,54E-32	1,43E-21	2,04E-18	0,0735	5,93E-11	0,228	0,677
				781	781	781	781	781	781	781	781	781
MWDegrees					-0,0465	0,00754	0,00539	0,0163	0,0101	-0,0278	-0,323	-0,273
					0,194	0,833	0,88	0,649	0,778	0,438	2,07E-20	8,40E-15
					781	781	781	781	781	781	781	781
SDofCE						-0,469	-0,381	0,208	0,121	0,125	-0,0507	0,0272
						5,95E-44	2,10E-28	4,42E-09	0,000732	0,000464	0,157	0,449
						781	781	781	781	781	781	781
absolute_Zellzahl							0,856	-0,246	-0,0823	0,271	0,022	-0,0647
							781	8,73E-226	3,37E-12	0,0214	1,36E-14	0,539
							781	781	781	781	781	781
normierte_Zellzahl								-0,209	-0,0679	0,229	0,00951	-0,0597
								3,82E-09	0,0577	9,16E-11	0,791	0,0953
								781	781	781	781	781
xPairColMax									-0,132	0,243	-0,0175	0,0135
									0,000215	5,58E-12	0,625	0,706
									781	781	781	781
PairColMax										-0,189	-0,103	-0,0127
										0,000000102	0,00407	0,723
										781	781	781
CEwithEdges											-0,00636	-0,0359
											0,859	0,317
											781	781
MWDegreeNN												0,735
												1,29E-133
												781
MedianDegreeNN												

Tab. 14: Kachel-basierte (**lokale**) Korrelationsanalyse der untersuchten Fluoreszenz-mikroskopisch erhobenen quantitativen Parameter der räumlichen Organisation. (Obere Zahl: Correlation Coefficient, mittlere Zahl: p-Wert, untere Zahl: Anzahl der Proben; Signifikanz grün markiert bei $p < 0,05$)

Im Folgenden werden daher nun zunächst Kachel-basiert (**lokal**) signifikante Korrelationen zwischen den Parametern der räumlichen Organisation graphisch inklusive Bestimmtheitsmaß dargestellt. Am Ende der Darstellung erfolgt die Angabe, welche der dargestellten paarweisen Korrelationen auch in der probenbasierten, **globalen** Betrachtungsweise einen signifikanten Zusammenhang aufwiesen. Auf die graphische Darstellung jener Korrelationsanalysen wurde aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit allerdings verzichtet. Nur die Korrelationen, die in der probenbasierten, aber nicht in der kachelbasierten Betrachtungsweise einen signifikanten Zusammenhang aufwiesen wurden im Anschluss separat graphisch in analoger Weise dargestellt.

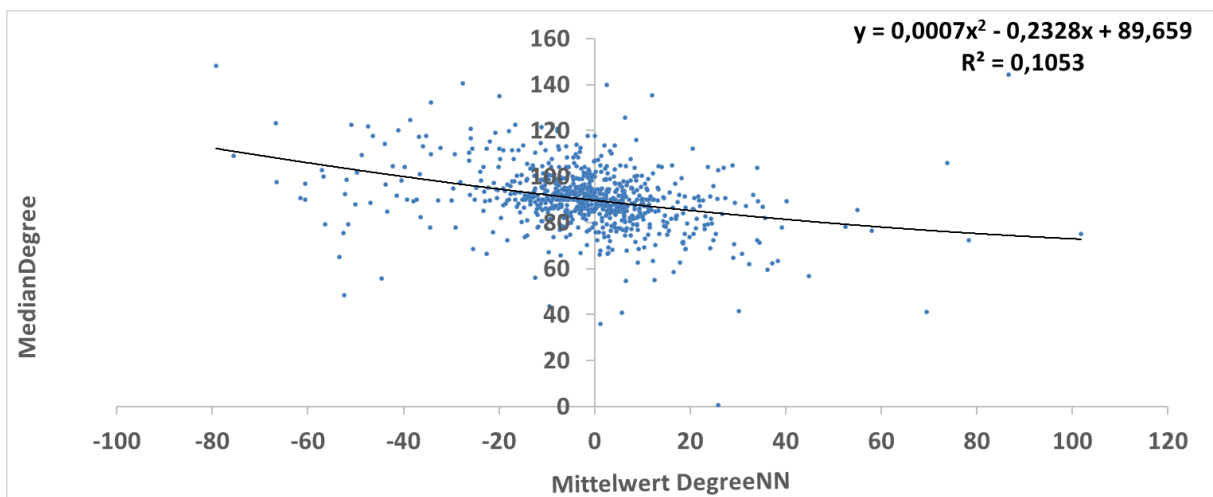
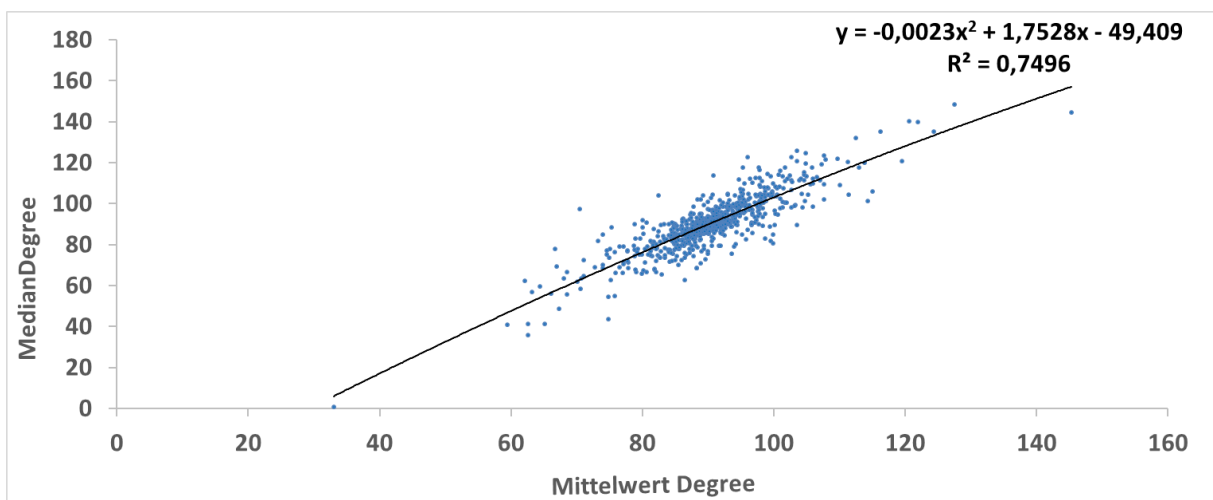
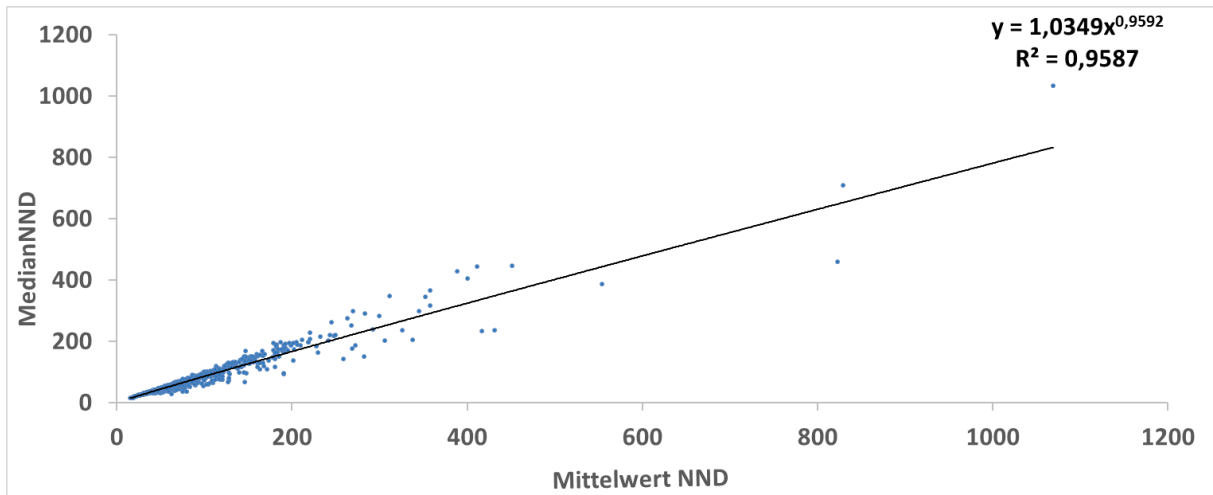


Abb. 93: Punktwolken-Diagramm von MedianNND und MittelwertNND (oben), MedianDegree und MittelwertDegree (mittig) sowie MedianDegree und MittelwertDegreeNN (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der **lokal**-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

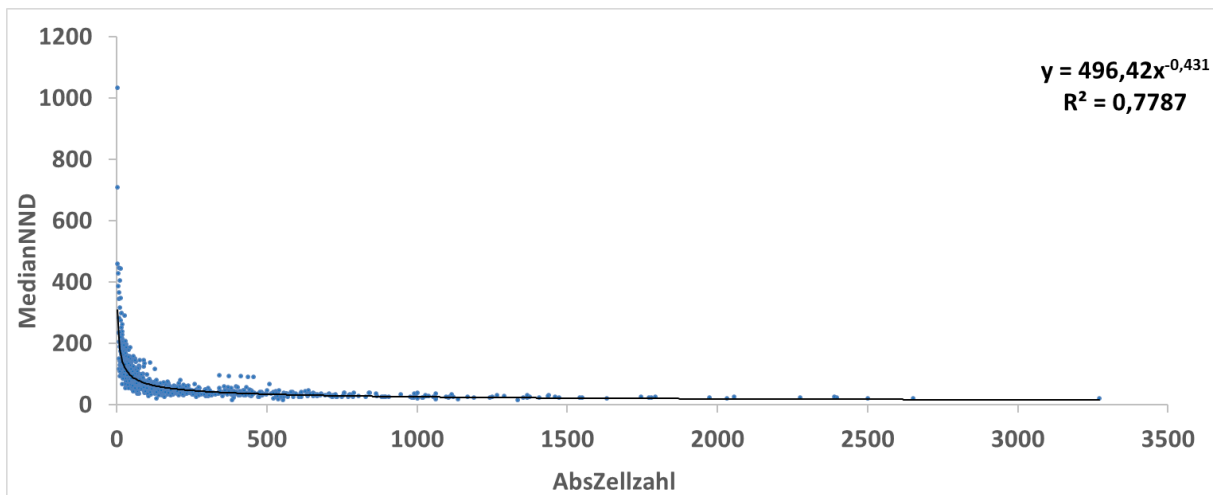
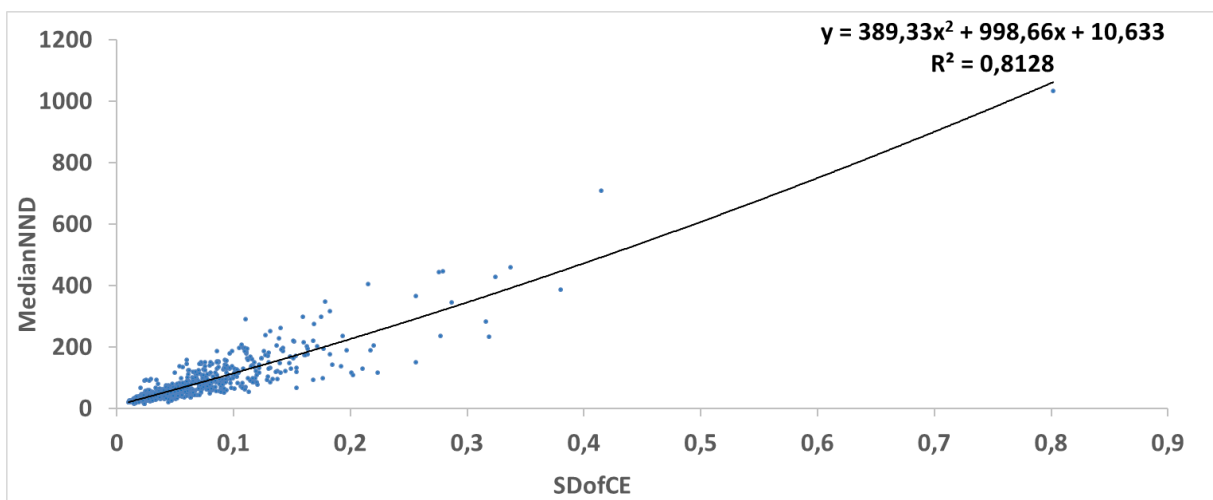
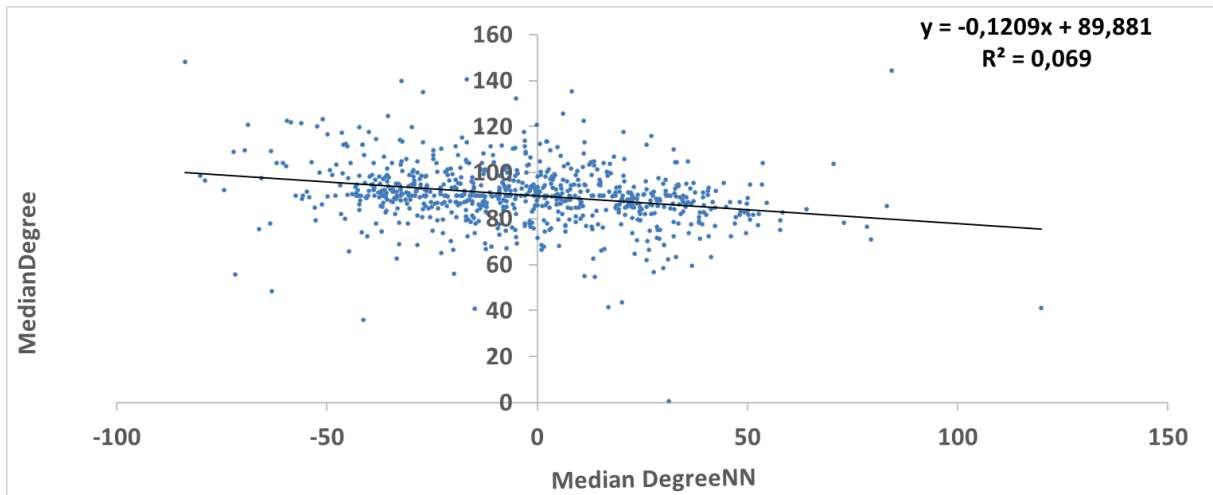


Abb. 94: Punktwolken-Diagramm von MedianDegree und MedianDegreeNN (oben), MedianNND und SDofCE (mittig) und MedianNND und Abs.Zellzahl (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der **lokal**-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

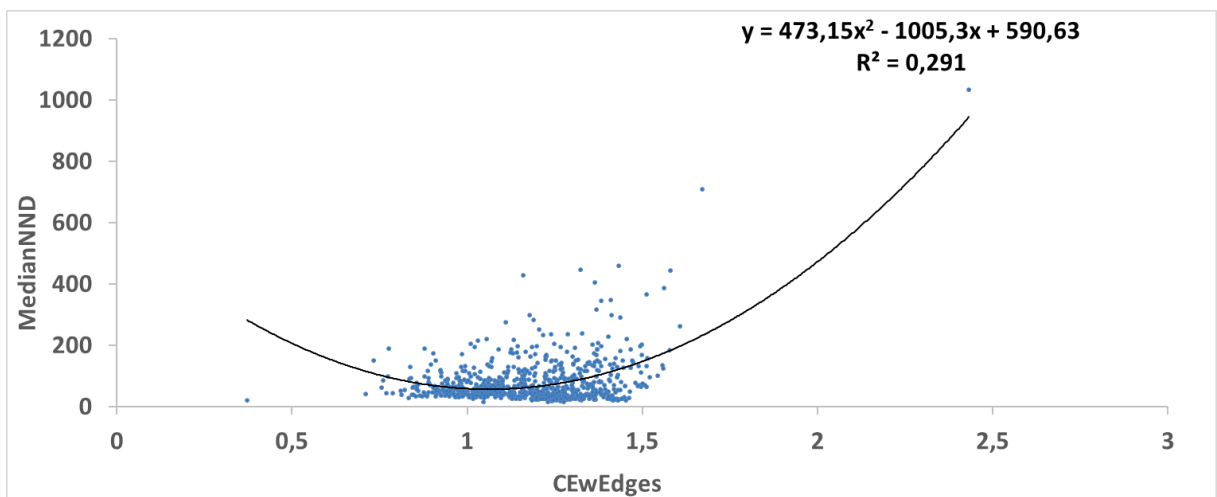
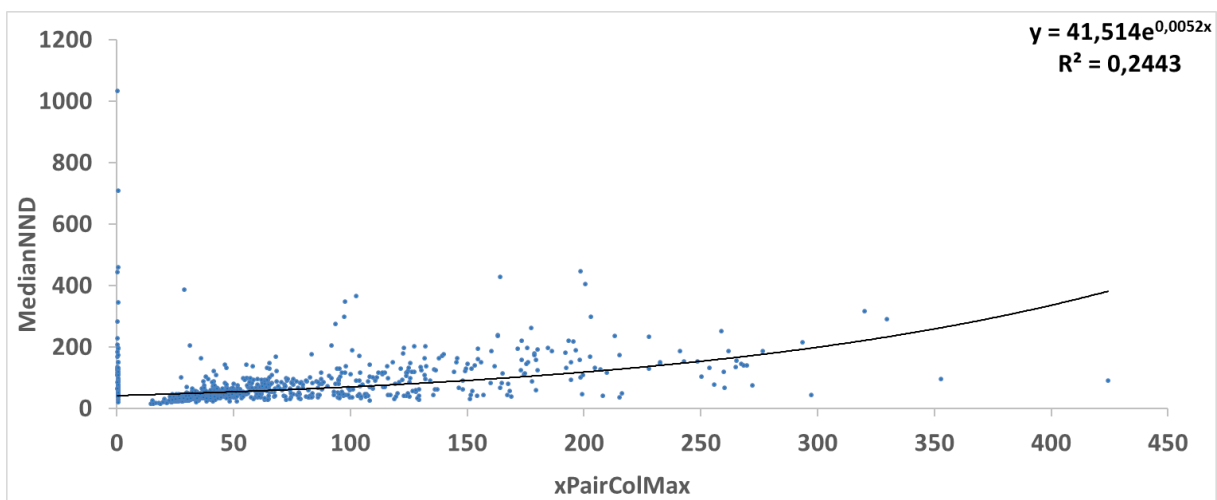
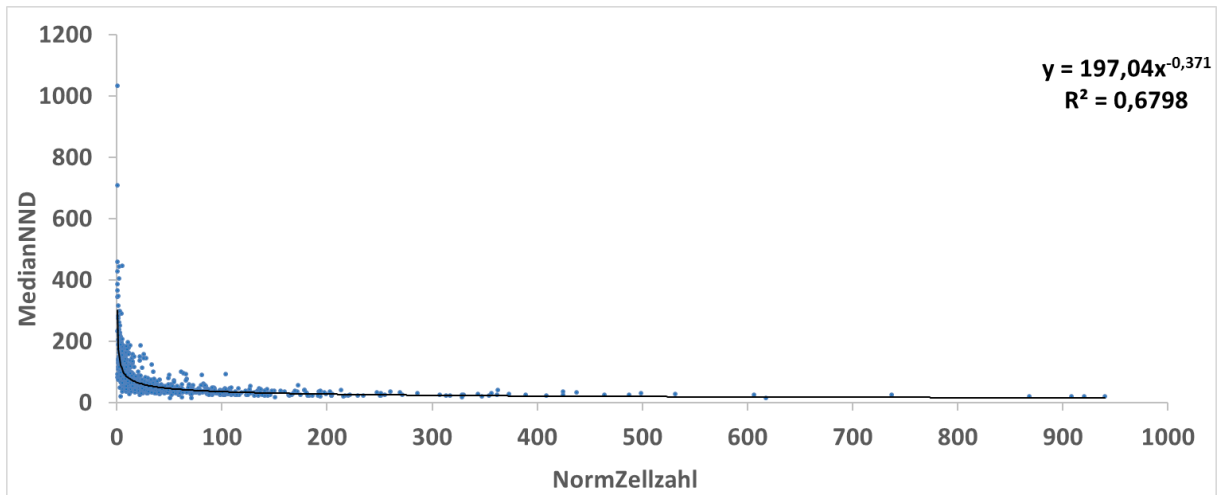


Abb. 95: Punktwolken-Diagramm von MedianNND und Norm.Zellzahl (oben), MedianNND und xPairColMax (mittig) sowie MedianNND und CEwEdges (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der **lokal**-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

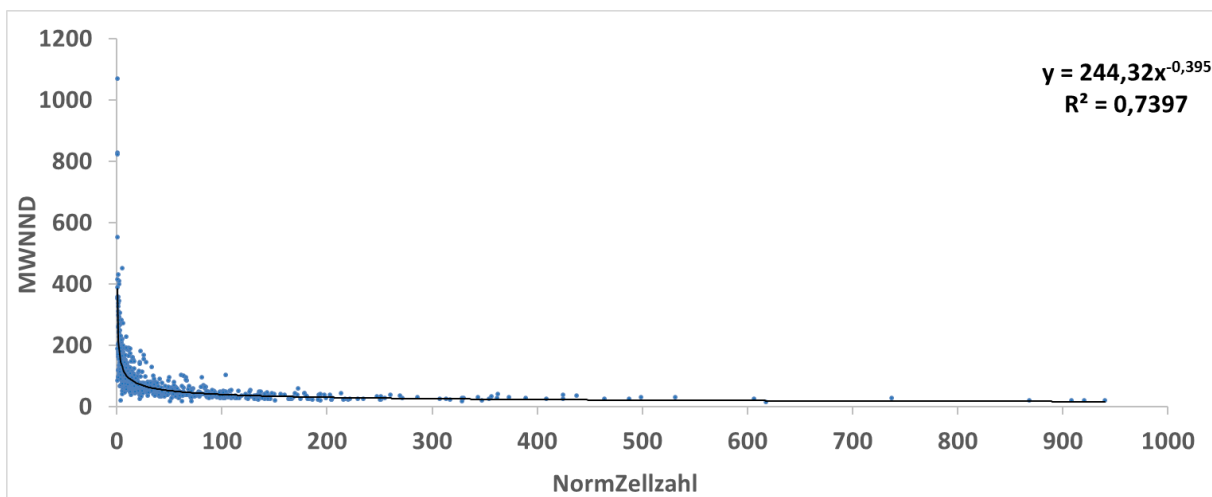
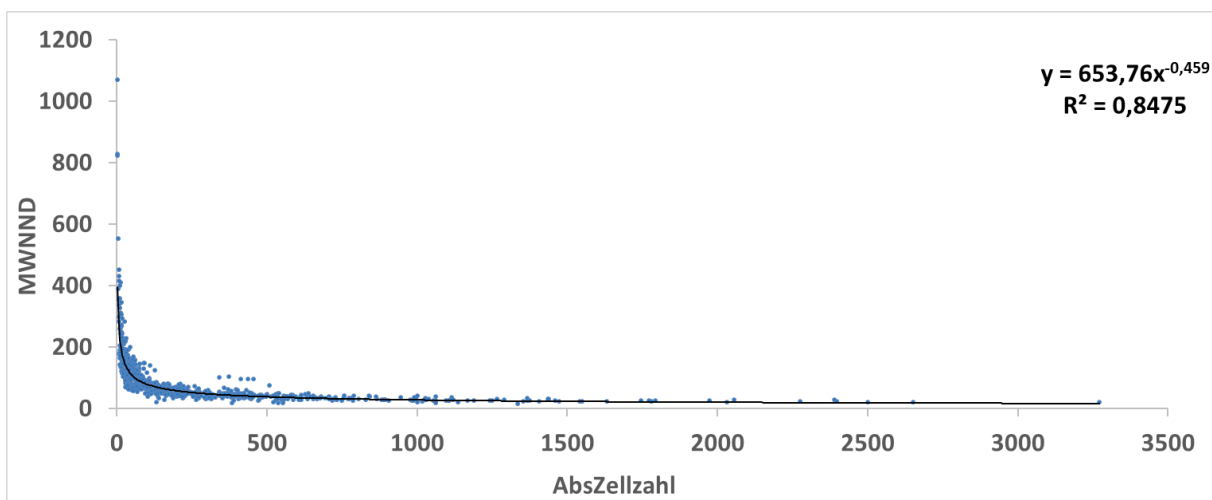
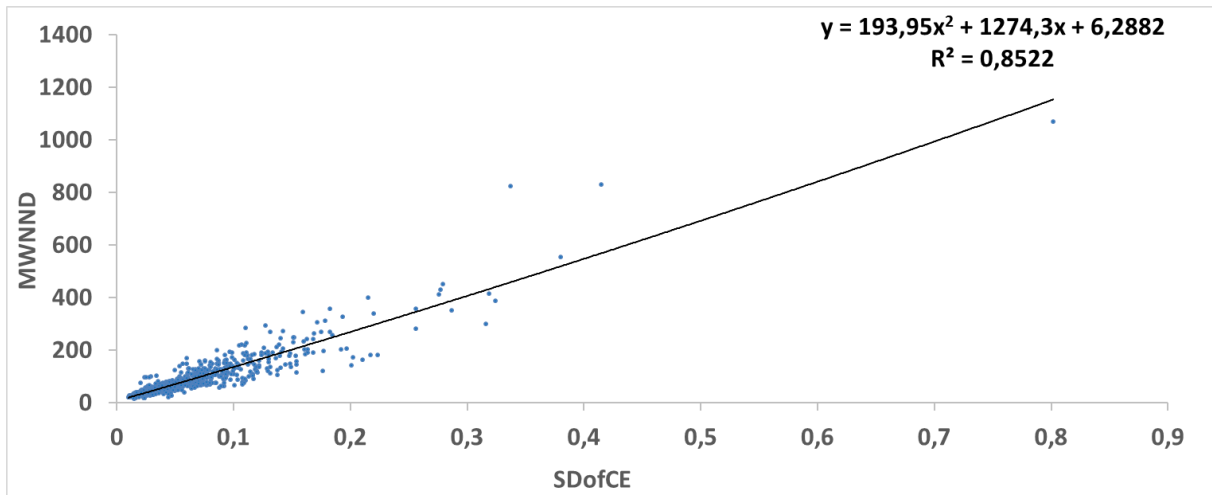


Abb. 96: Punktwolken-Diagramm von MWNND und SDofCE (oben), MWNND und Abs.Zellzahl (mittig) sowie MWNND und Norm.Zellzahl (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der **lokal**-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

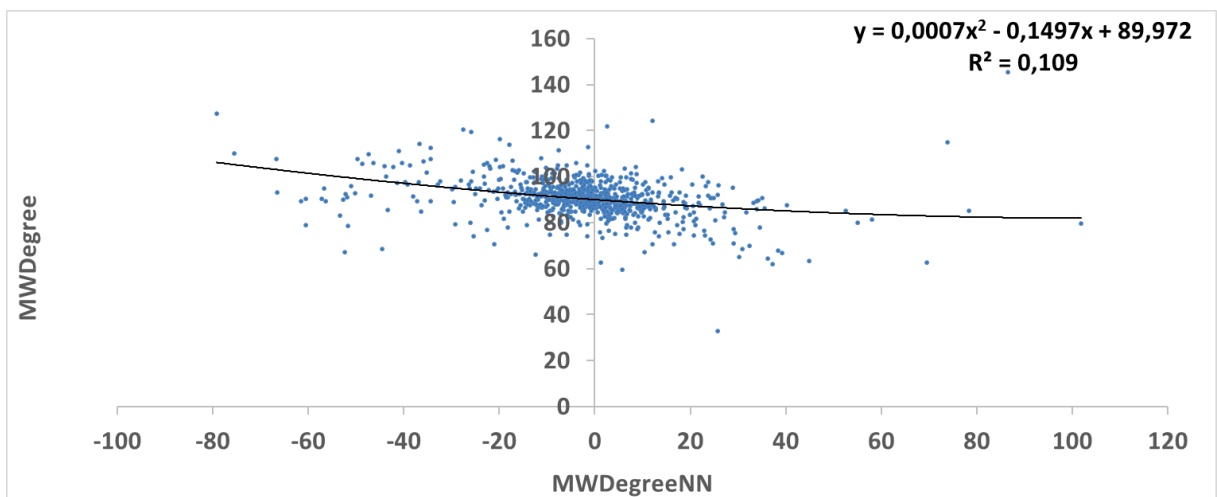
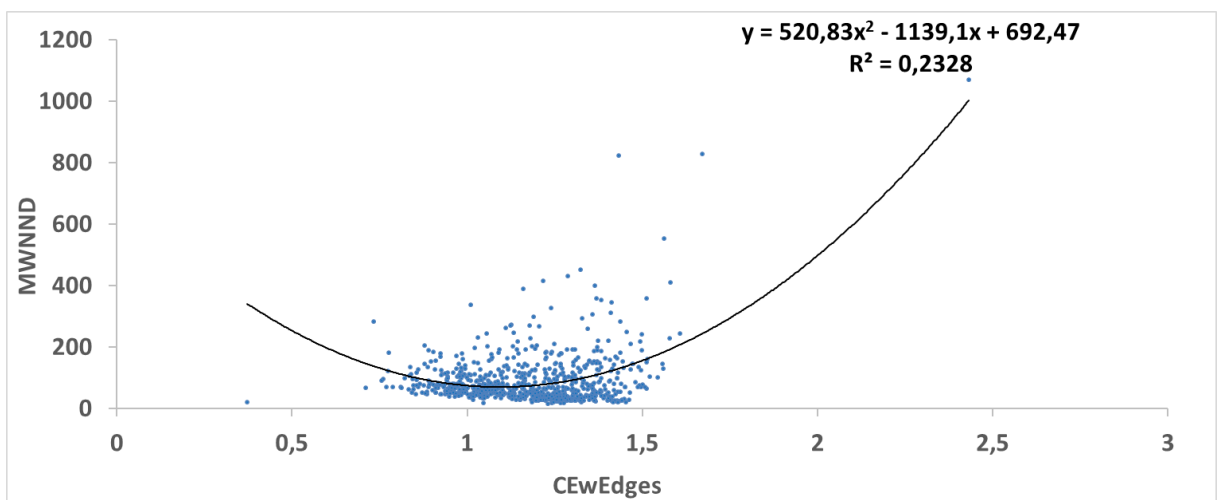
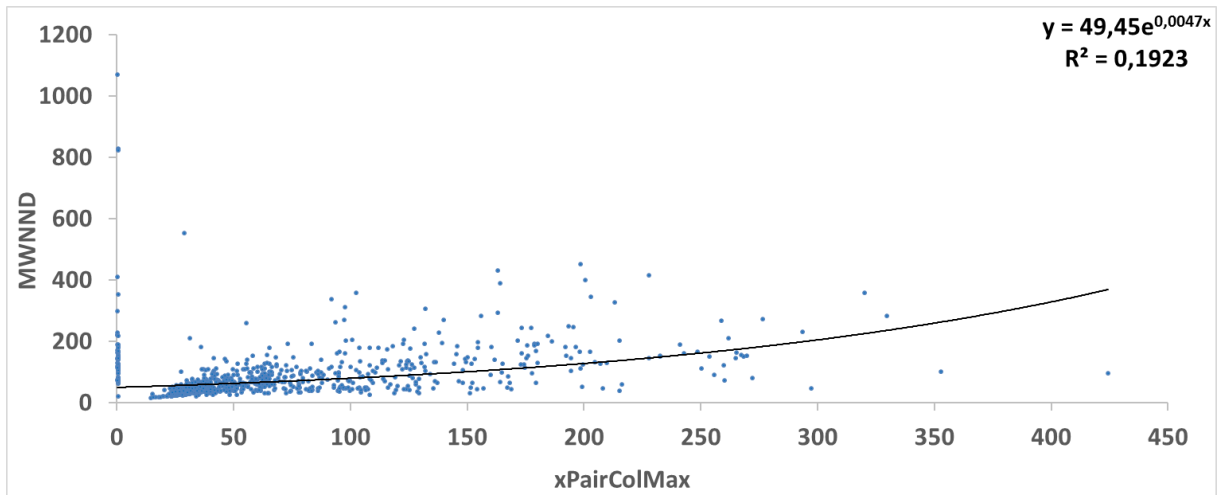


Abb. 97: Punktwolken-Diagramm von MWNND und xPairColMax (oben) MWNND und CEwEdges (mittig) sowie MWDegree und MWDegreeNN (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der **lokal**-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

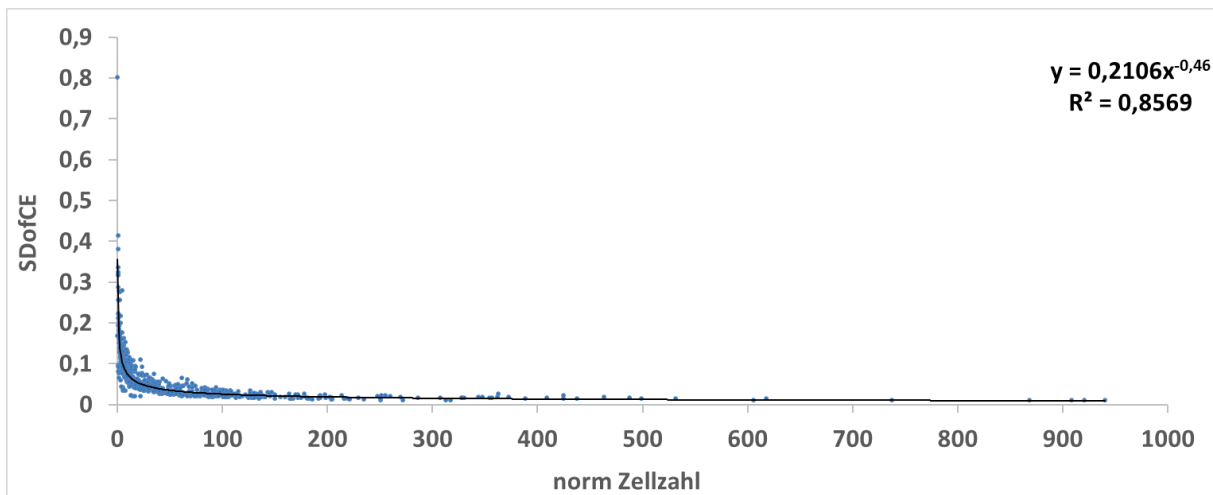
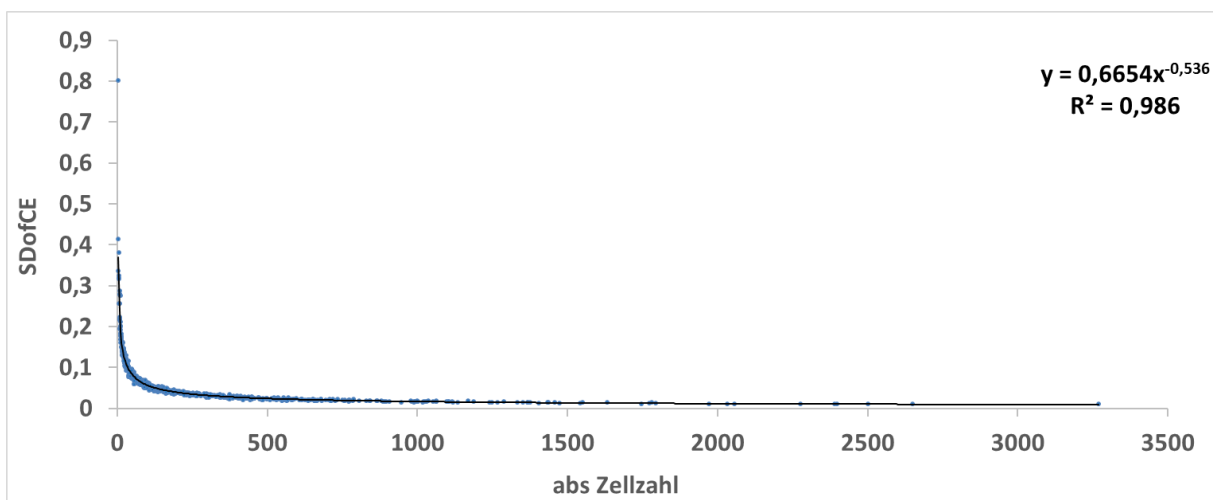
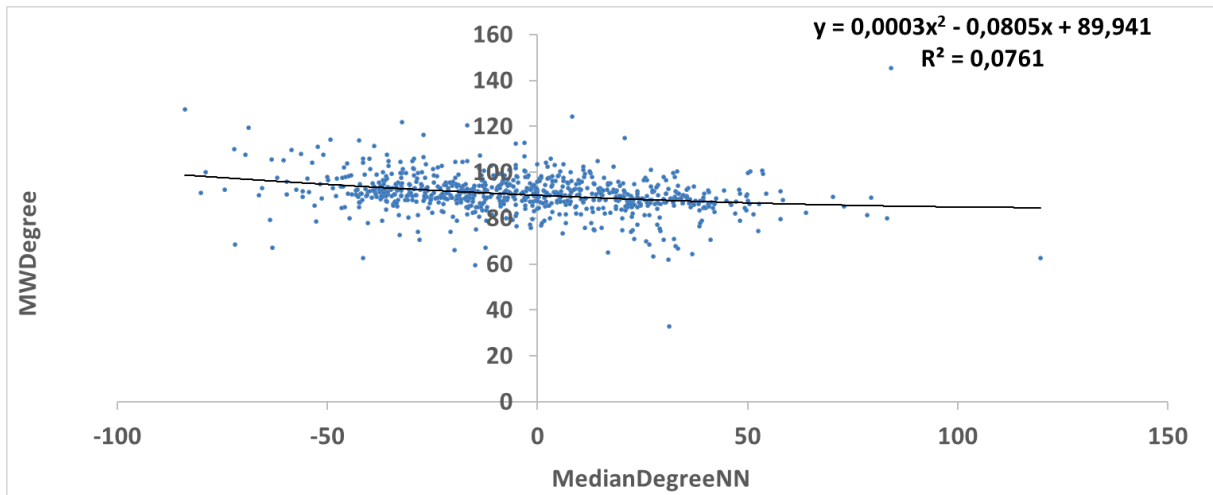


Abb. 98: Punktwolken-Diagramm von MWDegree und MedianDegreeNN (oben), SDofCE und abs.Zellzahl (mittig) sowie SDofCE und norm.Zellzahl (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der **lokal**-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

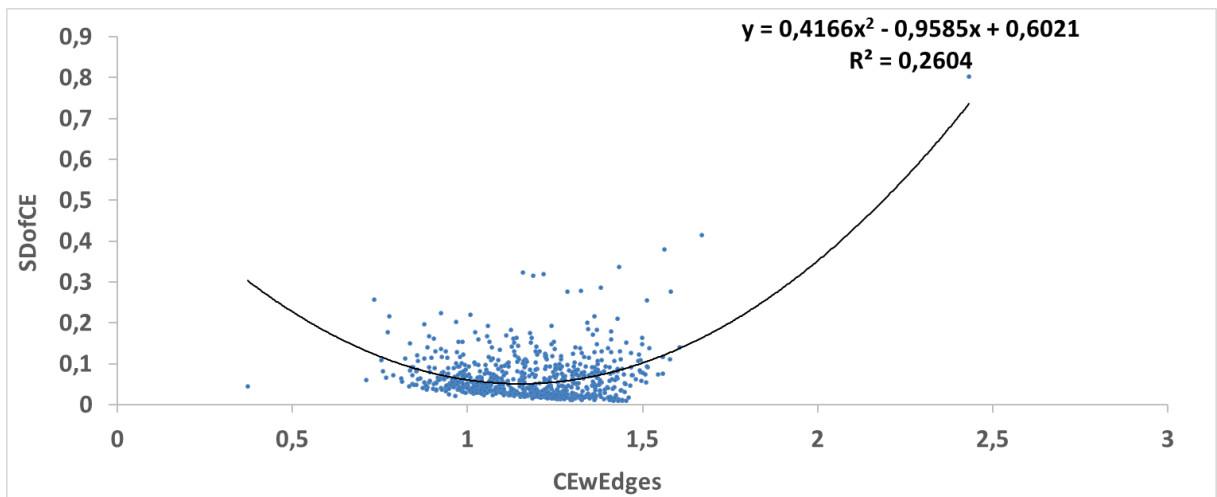
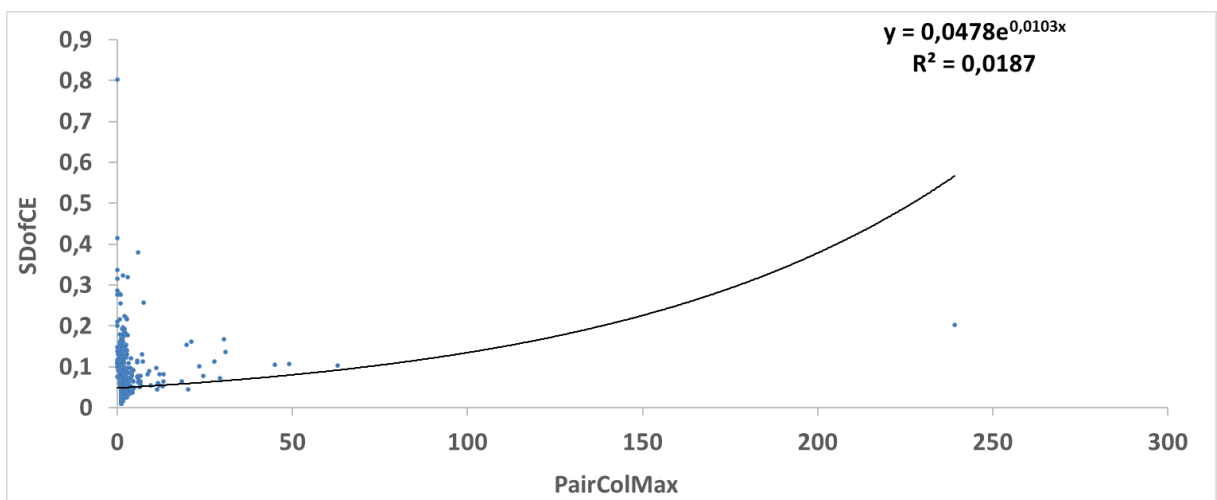
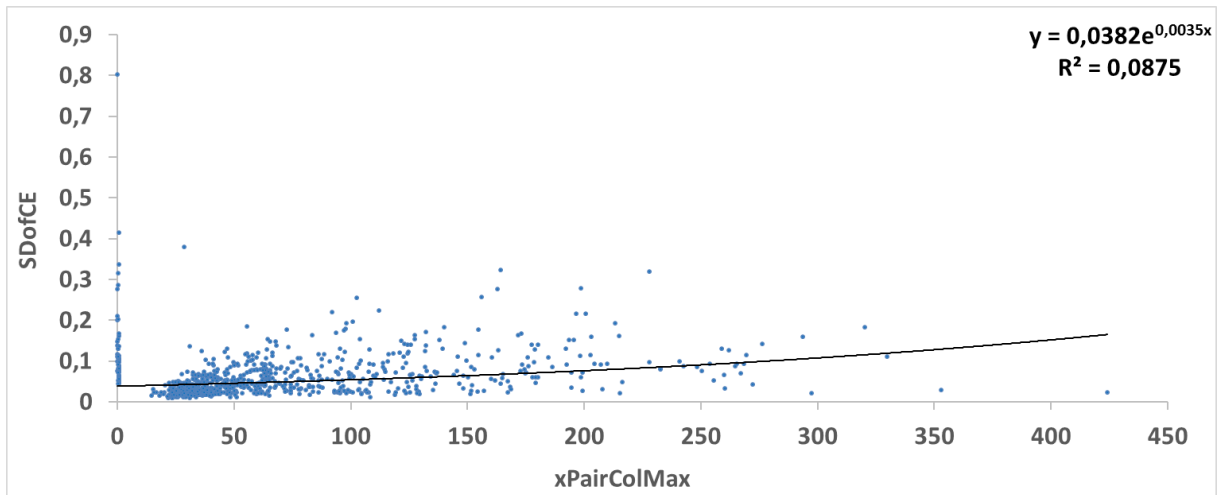


Abb. 99: Punktwolken-Diagramm von $SDofCE$ und $xPairColMax$ (oben), $SDofCE$ und $PairColMax$ (mittig) sowie $SDofCE$ und $CEwEdges$ (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der **lokal**-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

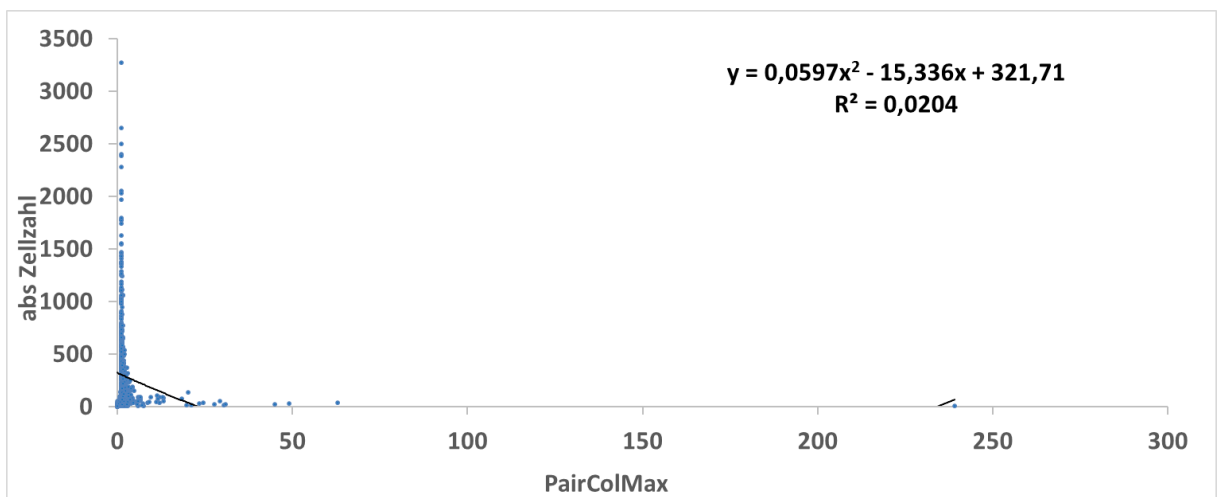
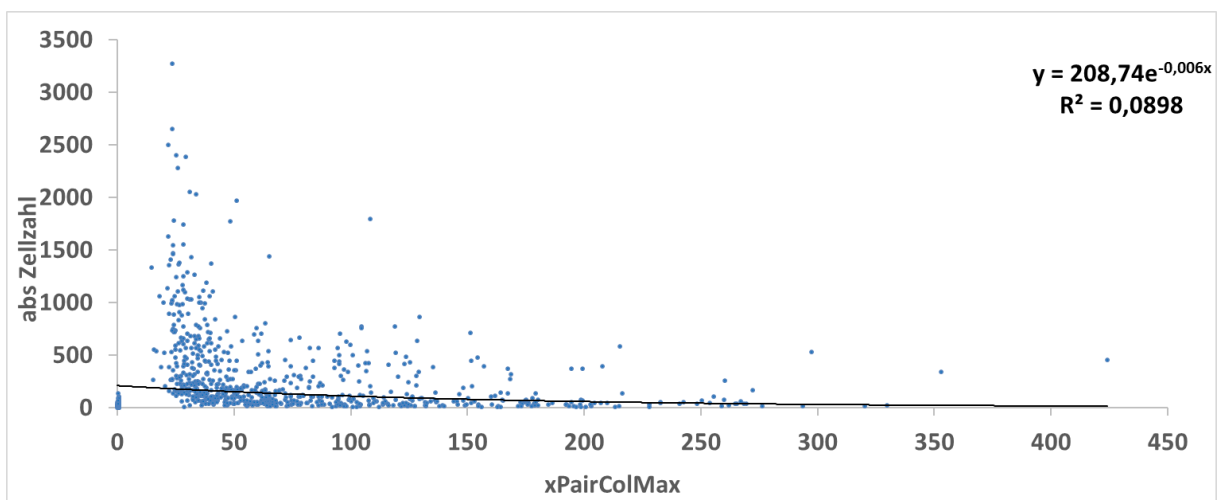
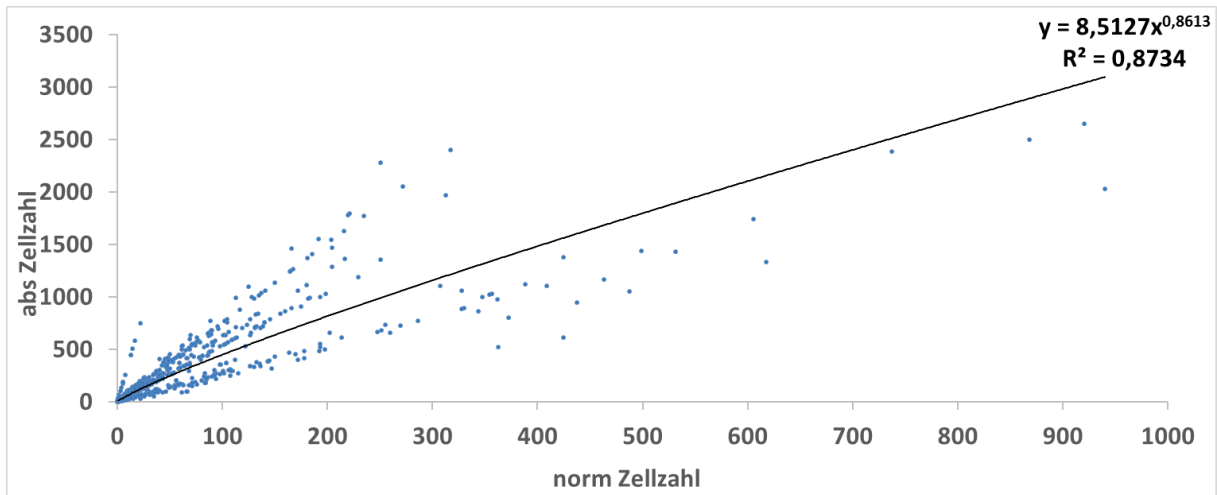


Abb. 100: Punktwolken-Diagramm von abs.Zellzahl und norm.Zellzahl (oben), abs.Zellzahl und xPairColMax (mittig) sowie abs.Zellzahl und PairColMax (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der **lokal**-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

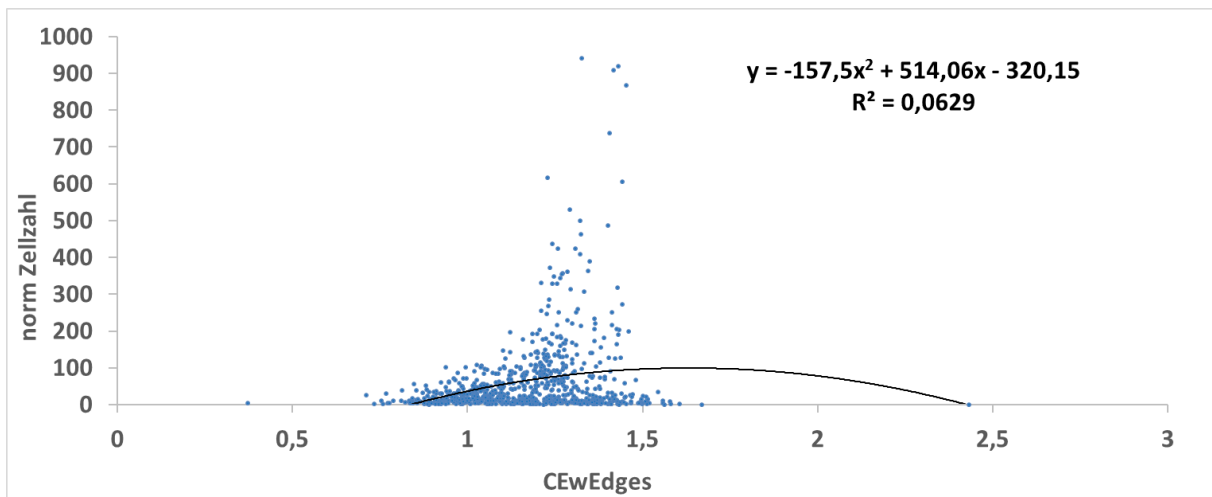
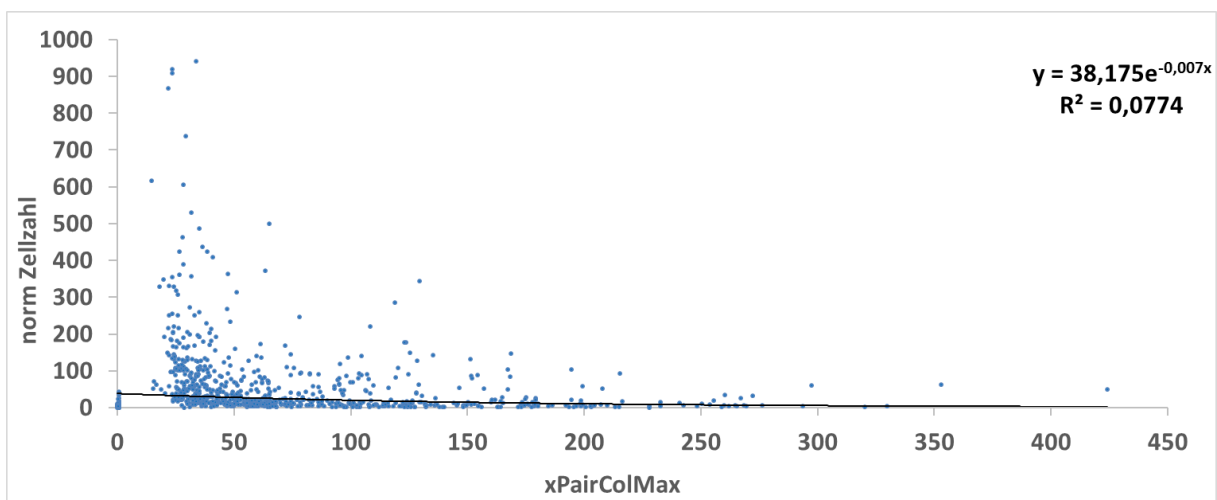
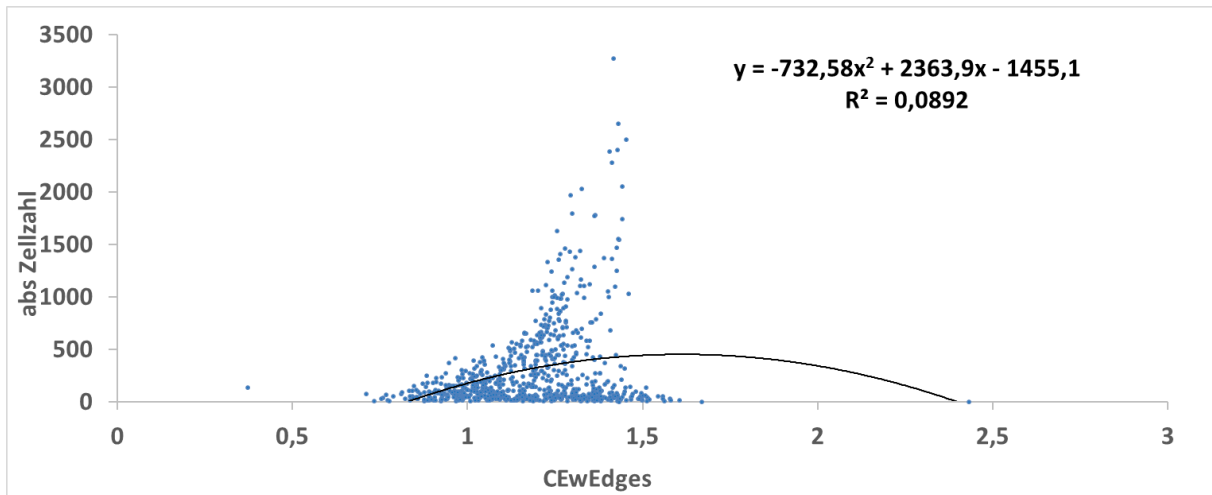


Abb. 101: Punktwolken-Diagramm von sowie abs.Zellzahl und CEwEdges (oben), norm.Zellzahl und xPairColMax (mittig) sowie norm.Zellzahl und CEwEdges (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der **lokal**-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

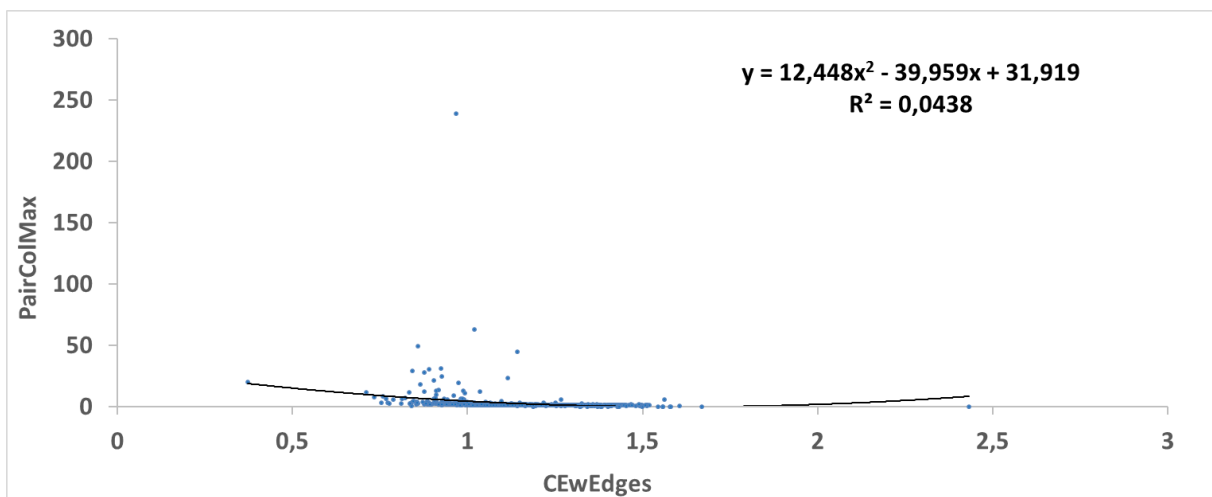
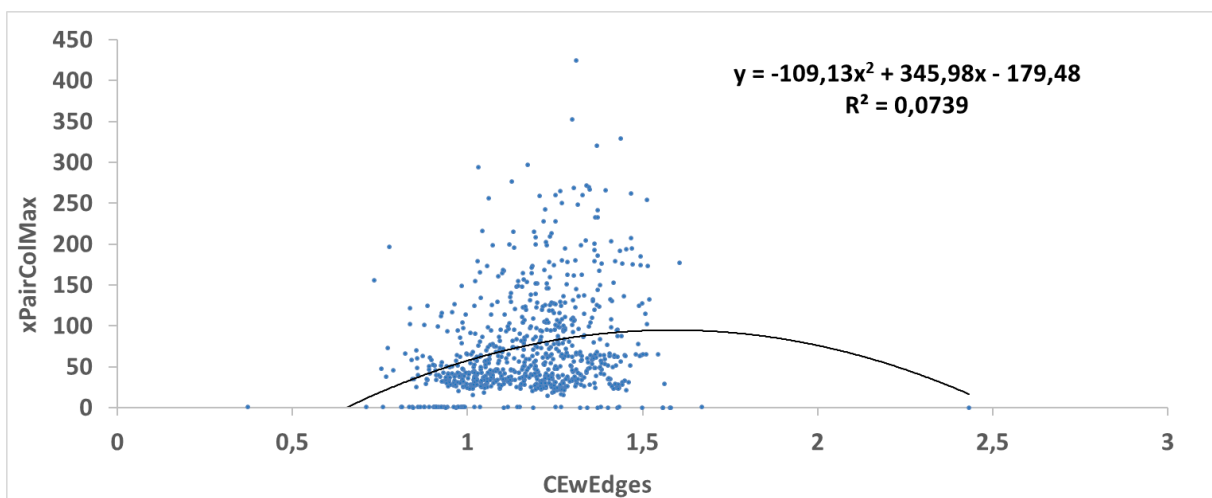
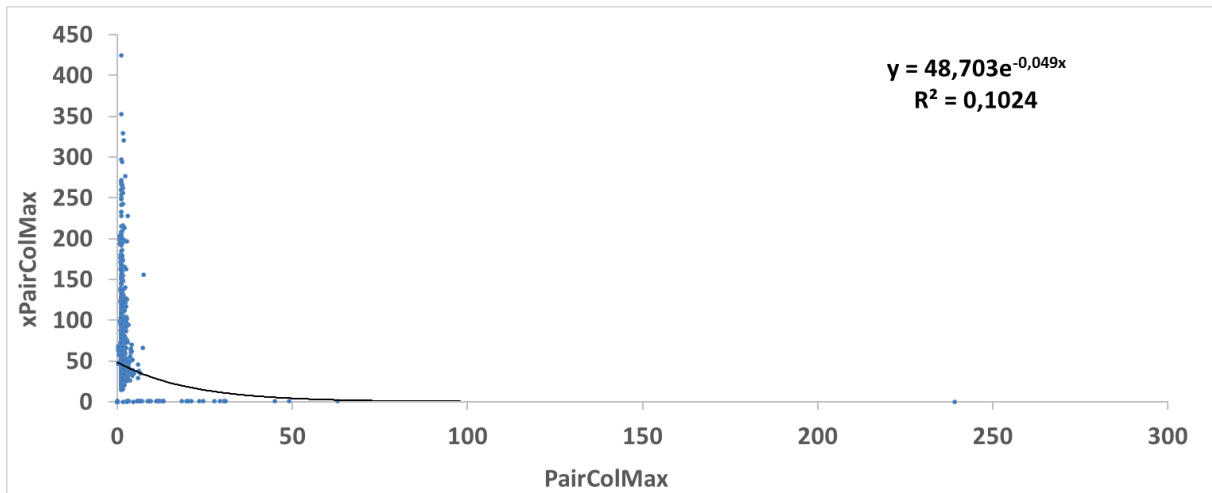


Abb. 102: Punktwolken-Diagramm von $xPairColMax$ und $PairColMax$ (oben) sowie $xPairColMax$ und $CEwEdges$ (mittig) sowie $PairColMax$ und $CEwEdges$ (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der **lokal**-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

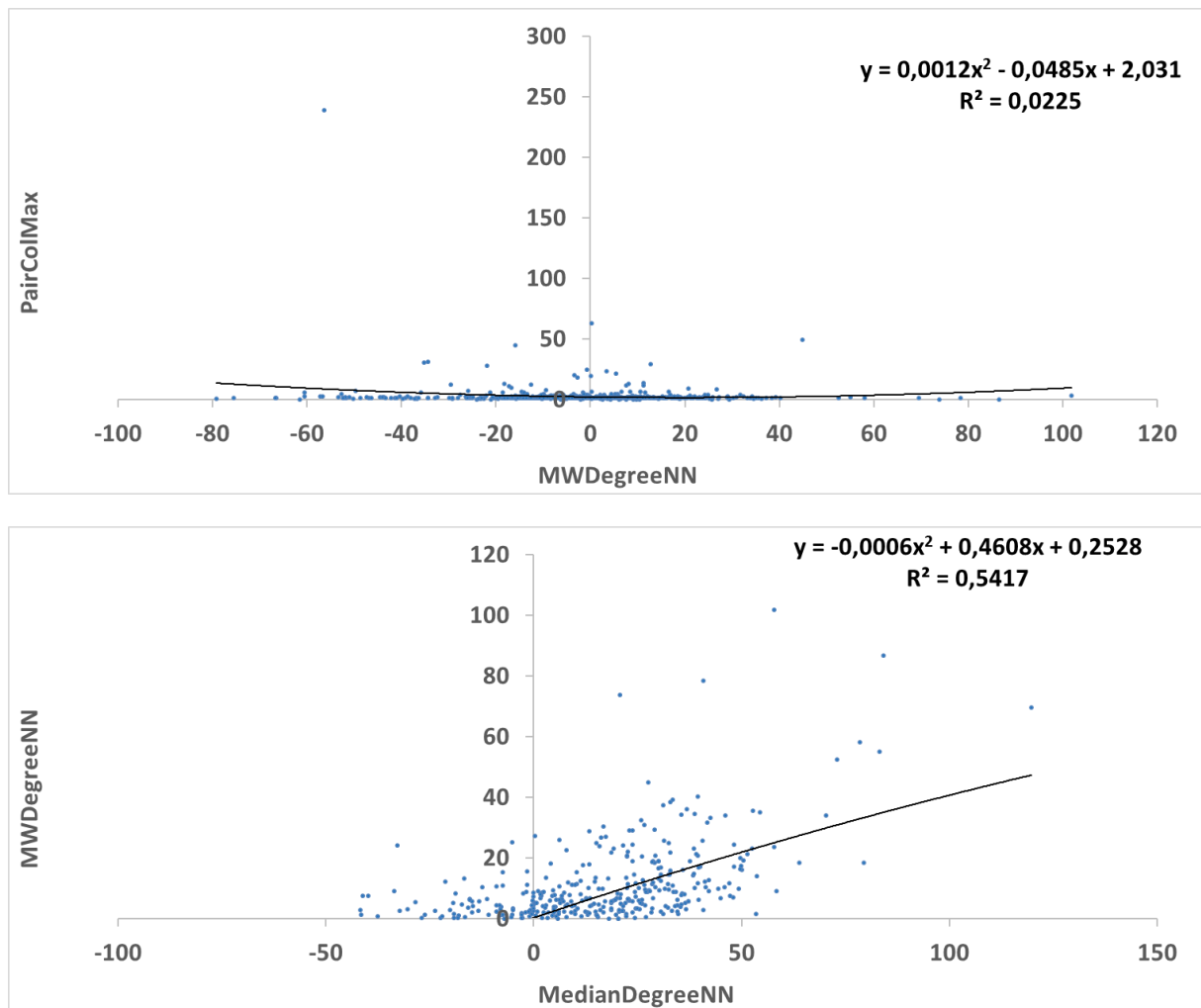


Abb. 103: Punktwolken-Diagramm von PairColMax und MWDegreeNN (oben), MWDegreeNN und MedianDegreeNN (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der **lokal**-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

Von diesen 31 dargestellten **lokalen**, Kachel-basierten Korrelationen (von 66 möglichen Korrelationen aller Parameter der quantitativen räumlichen Organisation) zeigten sich 23 auch in der **globalen**, Proben-basierten Analyse.

Diese waren:

- MedianNND mit: MWNND, SDofCE, abs.Zellzahl, norm.Zellzahl,
- MedianDegree mit: MWDegree, MWDegreeNN, MedianDegreeNN
- MWNND mit: SDofCE, abs.Zellzahl, norm.Zellzahl, CEwEdges,
- MWDegree mit: MWDegreeNN, MedianDegreeNN
- SDofCE mit: abs.Zellzahl, norm.Zellzahl, PairColMax, CEwEdges
- Abs.Zellzahl mit: norm.Zellzahl, PairColMax, CEwEdges,

- Norm.Zellzahl mit CEwEdges
- PairColMax mit CEwEdges
- MWDegreeNN mit MedianDegreeNN

Im Übrigen fanden sich die im Folgenden dargestellten drei Korrelationen in der **globalen**, Proben-basierten, aber nicht in der **lokalen**, Kachel-basierten Analyse.

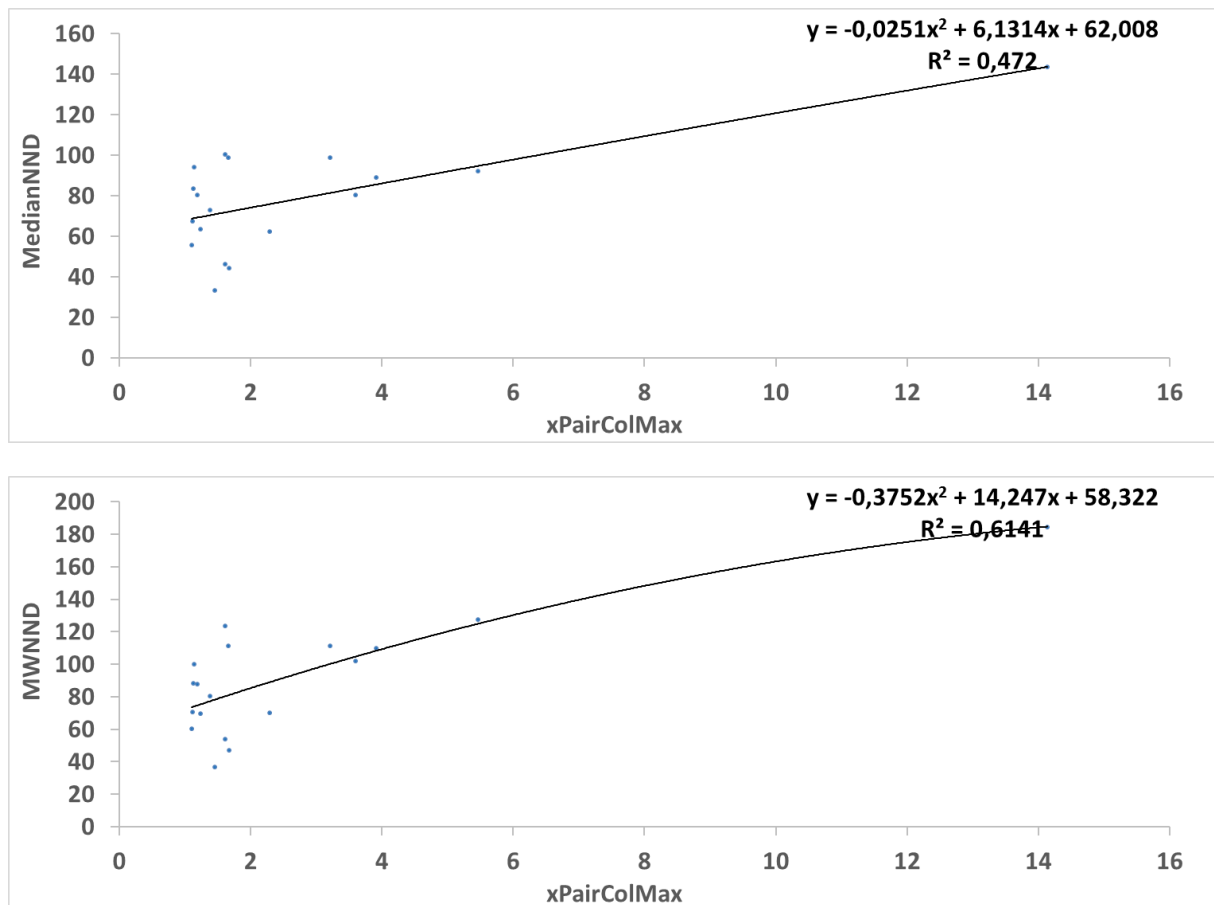


Abb. 104: Punktwolken-Diagramm von MedianNND und xPairColMax (oben) sowie MWNNND und xPairColMax (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der **global**-Proben-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

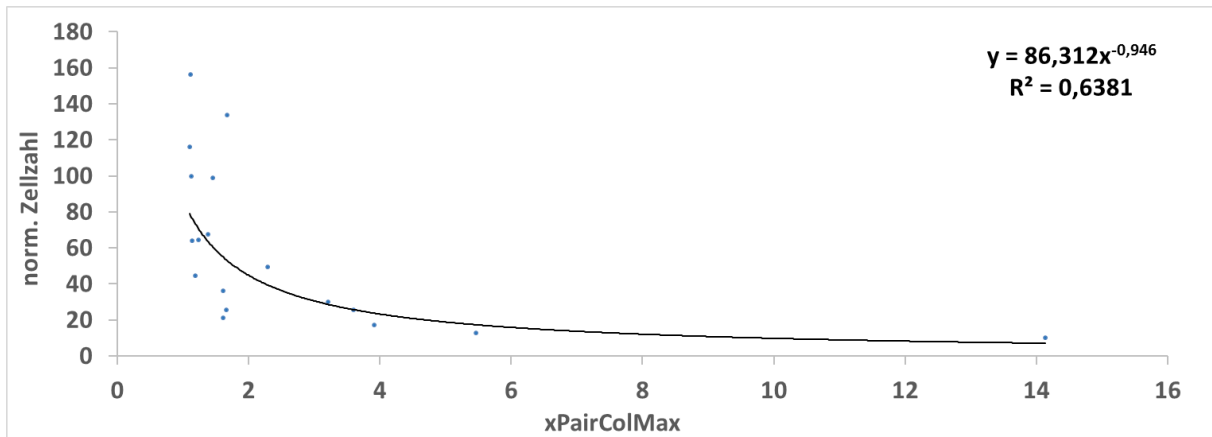


Abb. 105: Punktwolken-Diagramm von norm.Zellzahl und xPairColMax als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der **global**-Proben-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

In der **lokalen**, Kachel-basierten Betrachtung zeigten vier der insgesamt zwölf innerhalb der Gruppe quantitativen fluoreszenzmikroskopisch erhobenen Messparameter mit jeweils sieben anderen Parametern eine Korrelation (63,6%). Dies waren SDofCE, Absolute Zellzahl, xPairColMax und CEwithEdges.

In der **globalen**, Proben-basierten Betrachtung zeigten fünf Parameter jeweils sechs Korrelationen (54,5%) innerhalb der Gruppe quantitativen fluoreszenzmikroskopisch erhobenen Messparameter. Dies waren MWNND, SDofCE, Absolute Zellzahl, PairColMax und CEwithEdges.

3.8 Analyse signifikanter Korrelationen zwischen der Texturanalyse der REM-Bilder und den optisch-visuellen Klassifikationen (Scores)

Bei der Korrelations-Analyse der bei der Texturanalyse der REM-Bilder erhobenen Parameter mit den optisch-visuell erhobenen Scores zeigten sich deutlich mehr Korrelationen in der **lokalen** (Kachel-basierten) (18 von 20, 90%) als in der **globalen** (Proben-basierten) (8 von 20, 40%) Betrachtungsweise.

Proben-basierte, globale Pearson-Product-Correlation	REM vis globale Probe	EIMi vis Kachel- basiert	Makroskop. visuell	Pattern
	-0,546	-0,642	-0,224	-0,445
Angular Second Moment	0,0191	0,00409	0,372	0,0644
	18	18	18	18
	0,253	0,305	0,0331	0,243
Contrast	0,312	0,218	0,896	0,331
	18	18	18	18
	-0,4	-0,486	-0,162	-0,241
Correlation	0,0998	0,0411	0,521	0,335
	18	18	18	18
	-0,489	-0,605	-0,202	-0,459
Inverse Difference Moment	0,0397	0,00779	0,421	0,0553
	18	18	18	18
	0,609	0,666	0,237	0,54
Entropy	0,00733	0,00255	0,344	0,0208
	18	18	18	18

Tab. 15: Proben-basierte (**globale**) Korrelationsanalyse zwischen den Parametern der Grauwert-Texturanalyse der REM-Bilder und den optisch-visuell erhobenen Scores. (Obere Zahl: Correlation Coefficient, mittlere Zahl: p-Wert, untere Zahl: Anzahl der Proben; Signifikanz grün markiert bei $p < 0,05$)

Kachel-basierte, lokale Pearson-Product-Correlation	REM vis globale Probe	EIMi vis Kachel- basiert	Makroskop. visuell	Pattern
	-0,298	-0,484	-0,0973	-0,21
Angular Second Moment	1,793E-17	3,259E-47	0,00649	3,37E-09
	781	781	781	781
	0,148	0,249	0,00435	0,107
Contrast	0,0000338	1,805E-12	0,903	0,00269
	781	781	781	781
	-0,156	-0,312	-0,0427	-0,0835
Correlation	0,0000113	4,910E-19	0,233	0,0196
	781	781	781	781
	-0,362	-0,525	0,128	-0,271
Inverse Difference Moment	1,160E-25	1,427E-56	0,000321	1,414E-14
	781	781	781	781
	0,583	0,583	0,124	0,307
Entropy	3,217E-72	3,217E-72	0,000515	1,505E-18
	781	781	781	781

Tab. 16: Kachel-basierte (**lokale**) Korrelationsanalyse zwischen den Parametern der Grauwert-Texturanalyse der REM-Bilder und den optisch-visuell erhobenen Scores. (Obere Zahl: Correlation Coefficient, mittlere Zahl: p-Wert, untere Zahl: Anzahl der Proben; Signifikanz grün markiert bei $p < 0,05$)

Im Folgenden werden daher nun zunächst Kachel-basiert (lokal) signifikante Korrelationen zwischen den in der Texturanalyse der rasterelektronenmikroskopischen Bilder erhobenen Parametern und den Parametern der optisch-visuellen Scores graphisch inklusive Bestimmtheitsmaß dargestellt. Am Ende der Darstellung erfolgt die Angabe, welche der dargestellten paarweisen Korrelationen auch in der probenbasierten, globalen Betrachtungsweise einen signifikanten Zusammenhang aufwiesen. Auf die graphische Darstellung jener Korrelationsanalysen wurde aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit allerdings verzichtet.

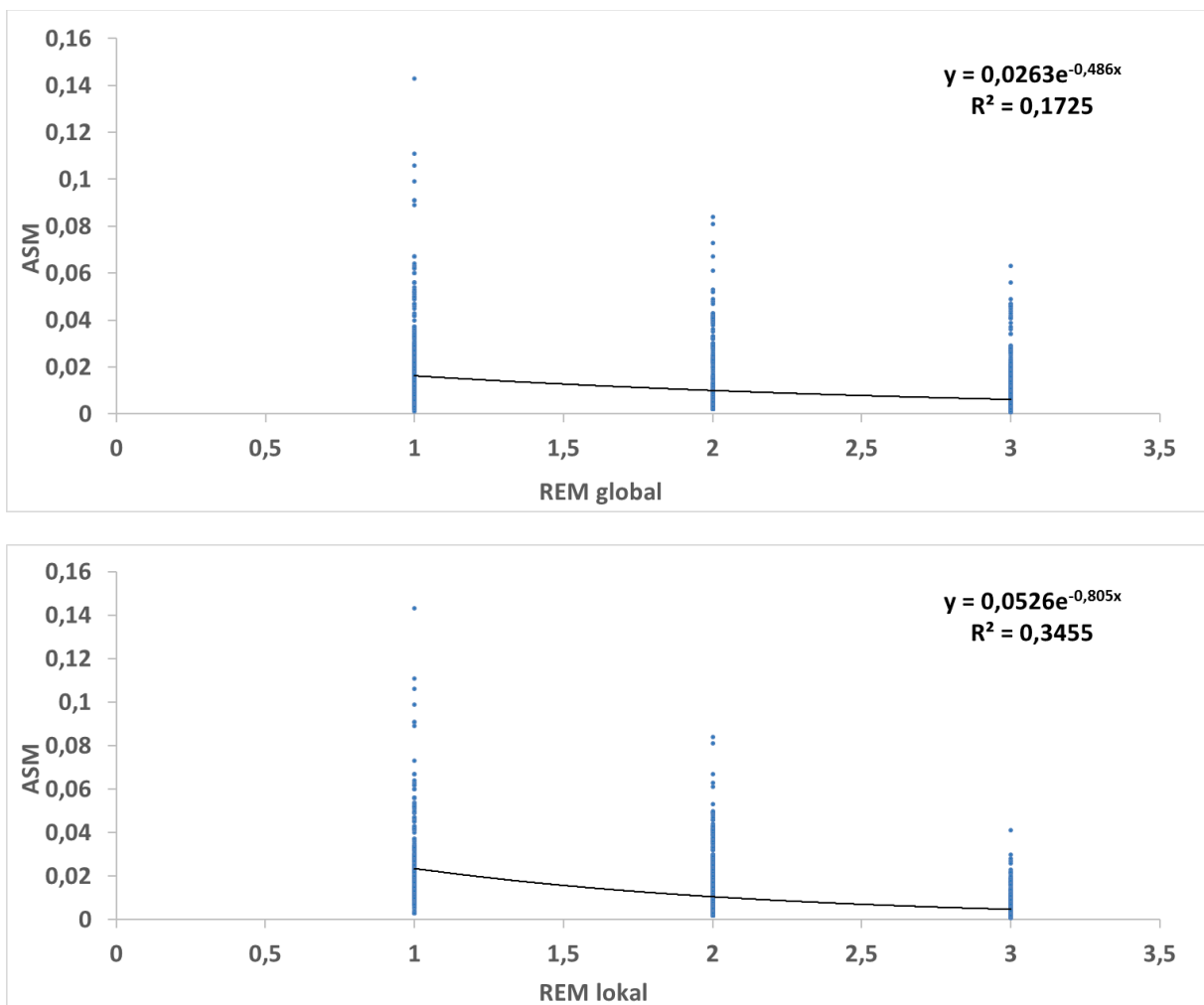


Abb. 106: Punktwolken-Diagramm von ASM und **REM global** sowie von ASM und **REM lokal** (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der **lokal**-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

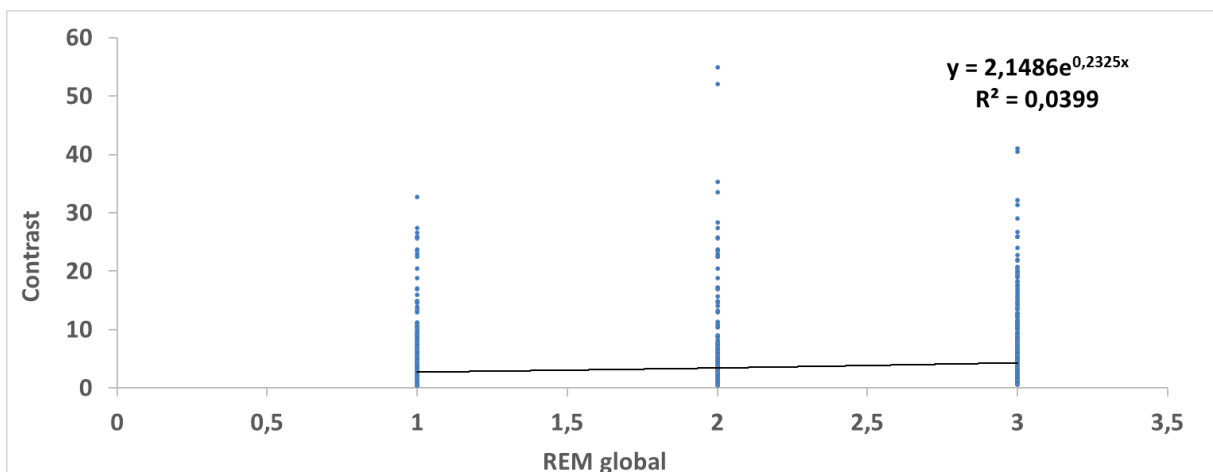
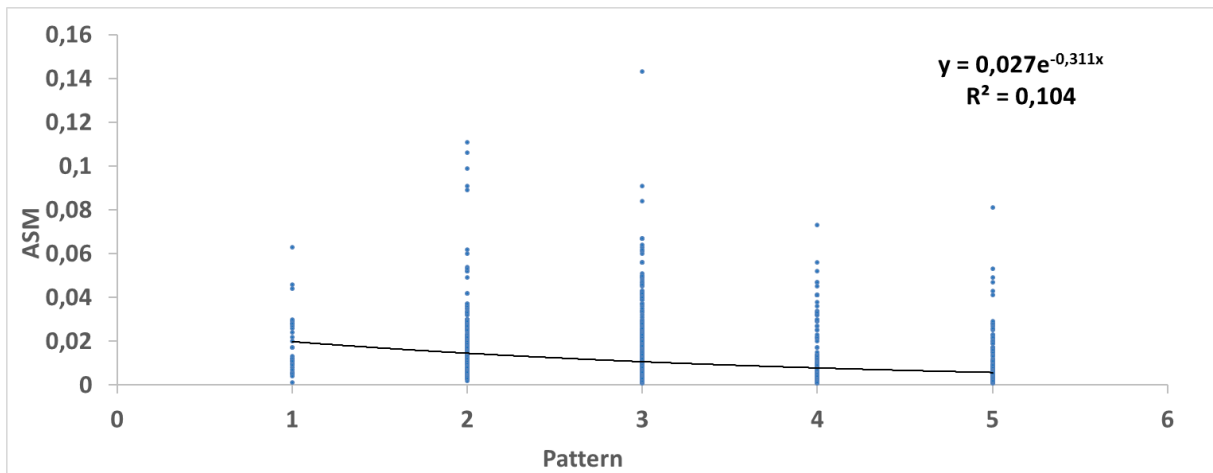
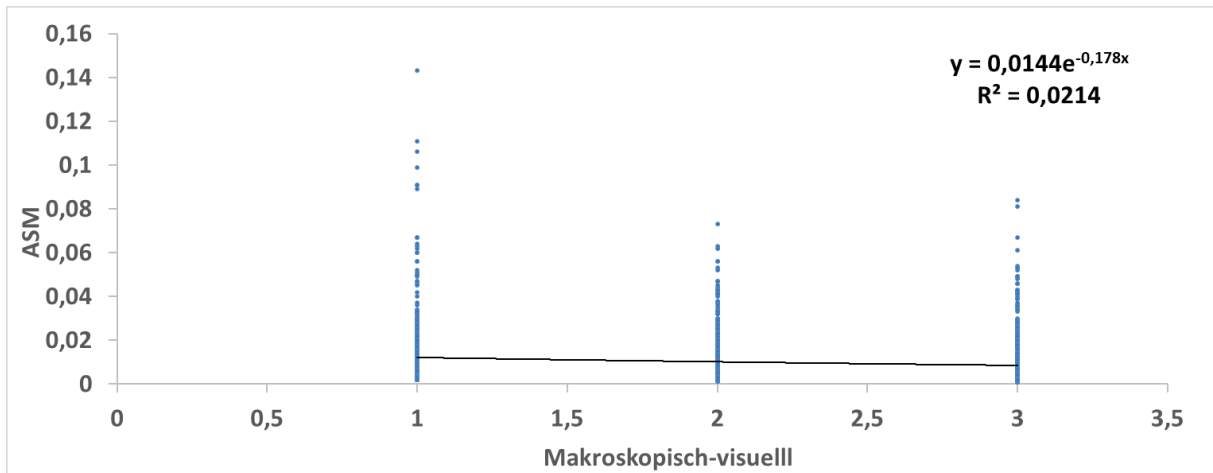


Abb. 107: Punktwolken-Diagramm von makroskopisch-visuell (oben), ASM und Pattern (mittig) sowie Contrast und **REM global** (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der **lokal**-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

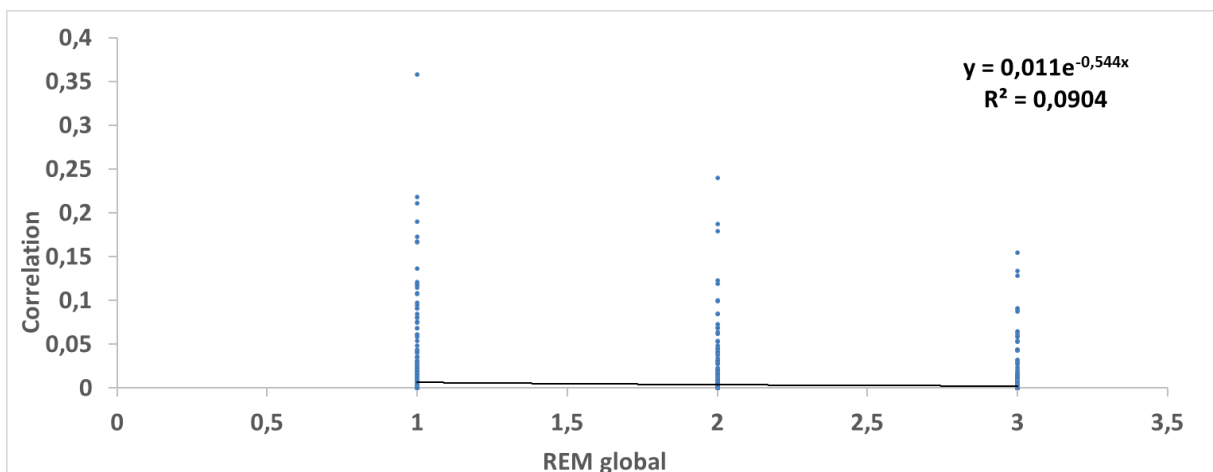
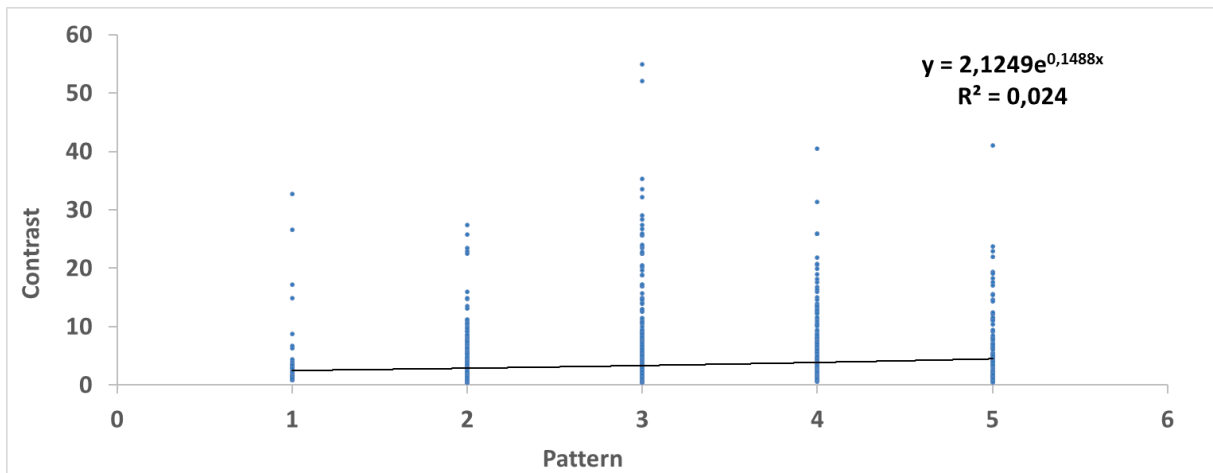
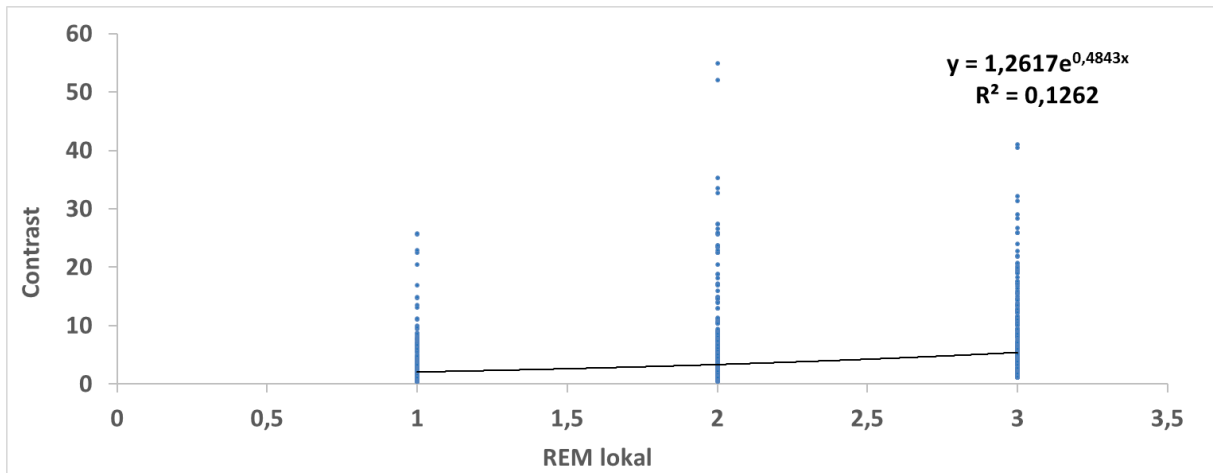


Abb. 108: Punktwolken-Diagramm von Contrast und **REM lokal** (oben) sowie Contrast und **Pattern** (mittig) sowie Correlation und **REM global** (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der **lokal-Kachel-basierten Analyse**. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

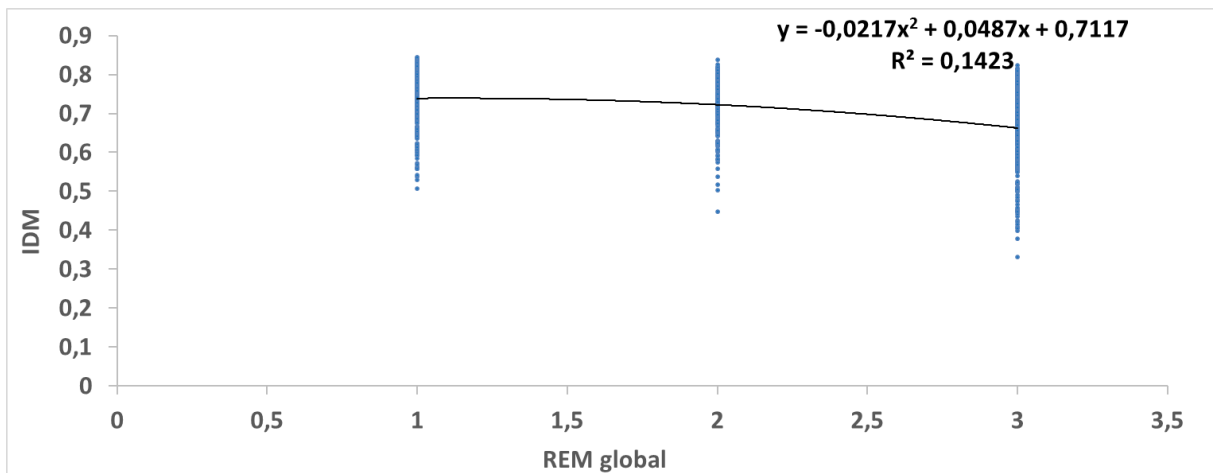
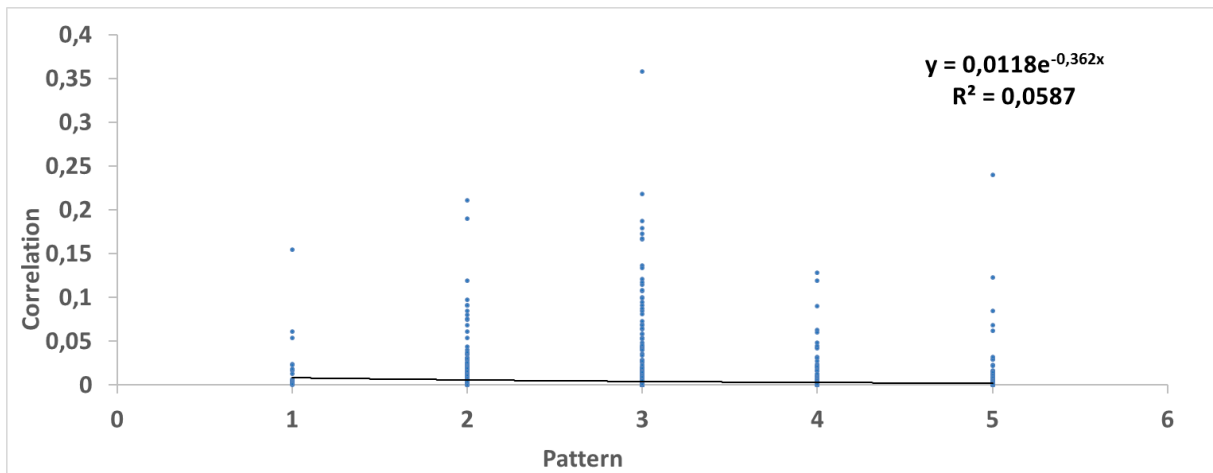
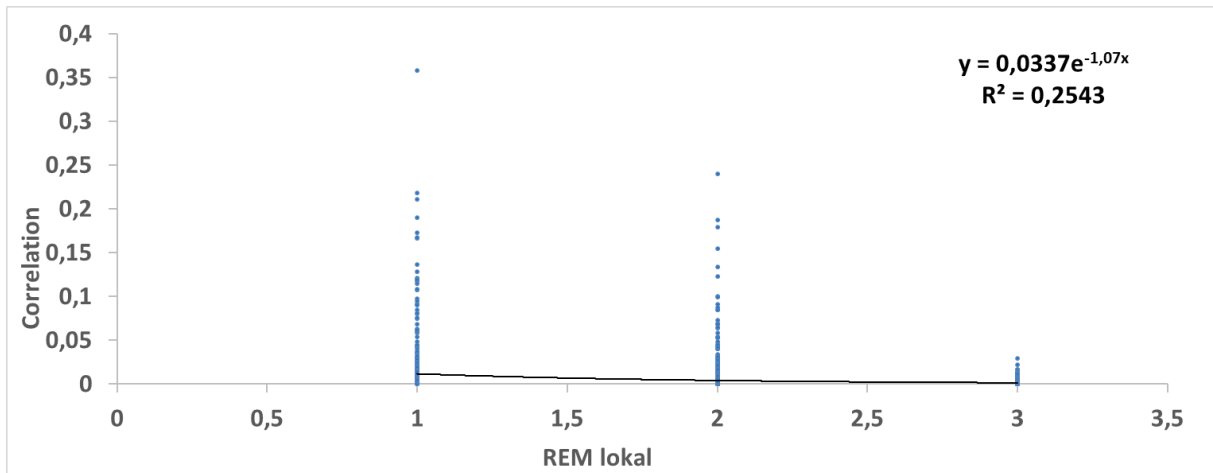


Abb. 109: Punktwolken-Diagramm von Correlation und **REM lokal** (oben), Correlation und **Pattern** (mittig) sowie IDM und **REM global** (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der **lokal-Kachel-basierten Analyse**. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

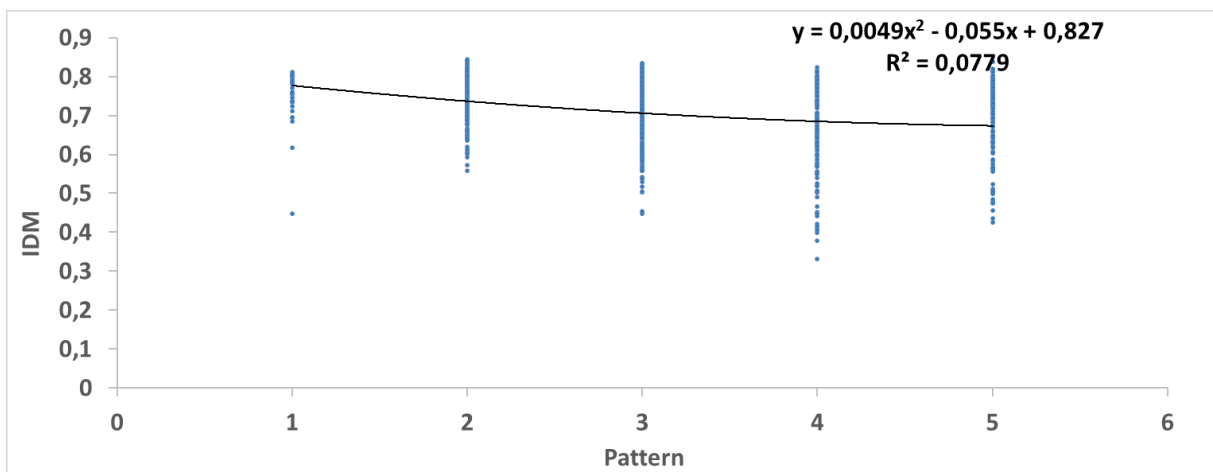
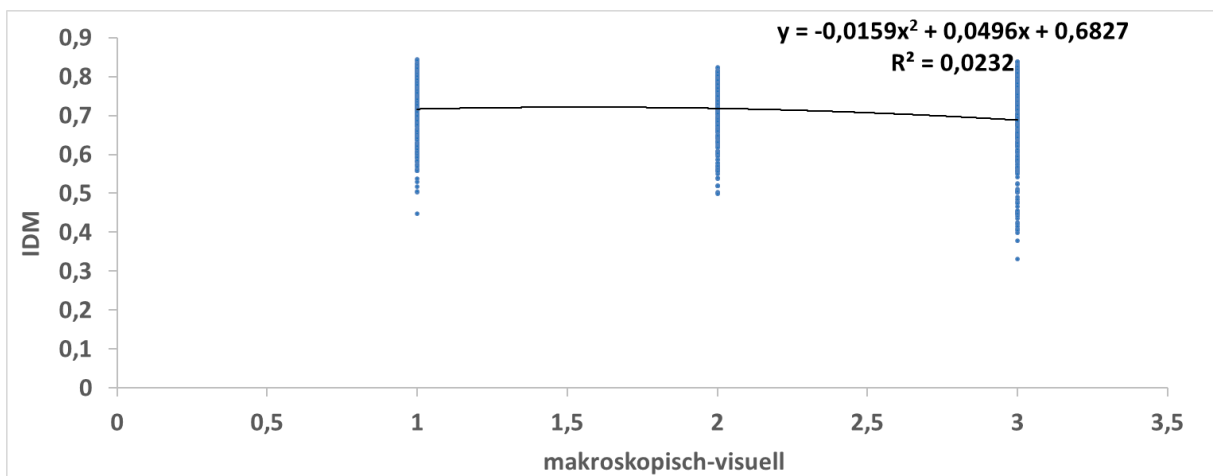
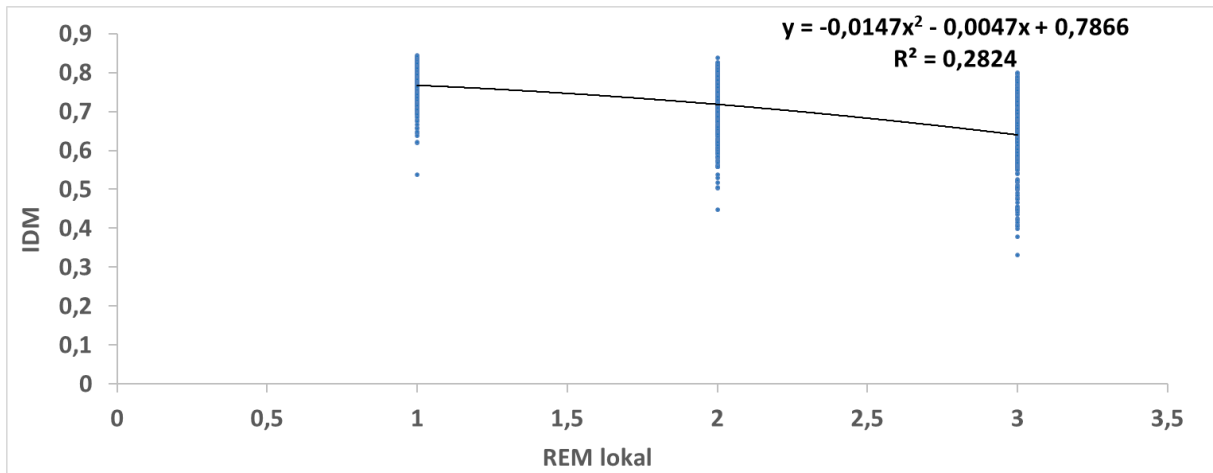


Abb. 110: Punktwolken-Diagramm von IDM und **REM lokal** (oben) sowie IDM makroskopisch-visuell (mittig) sowie IDM und Pattern (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der **lokal**-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

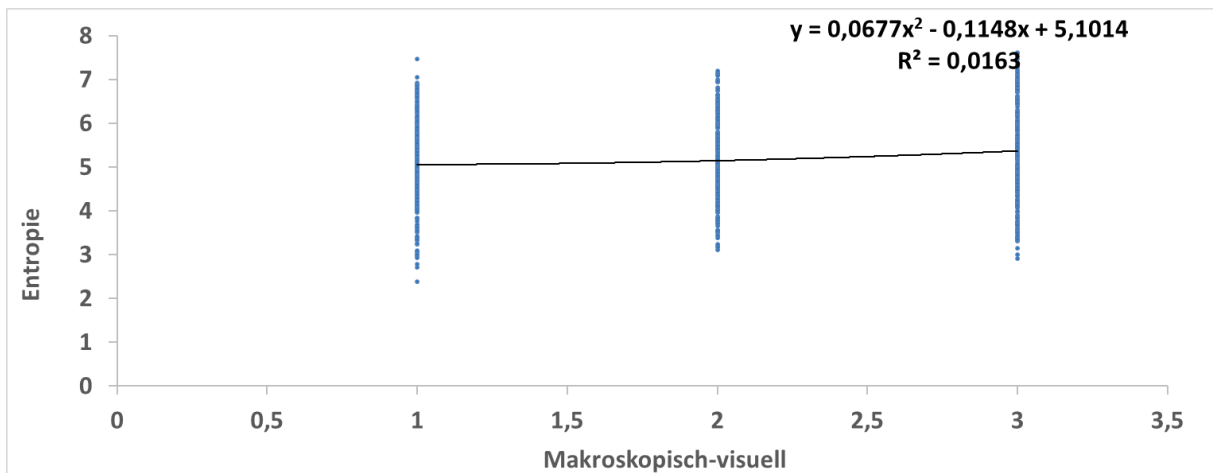
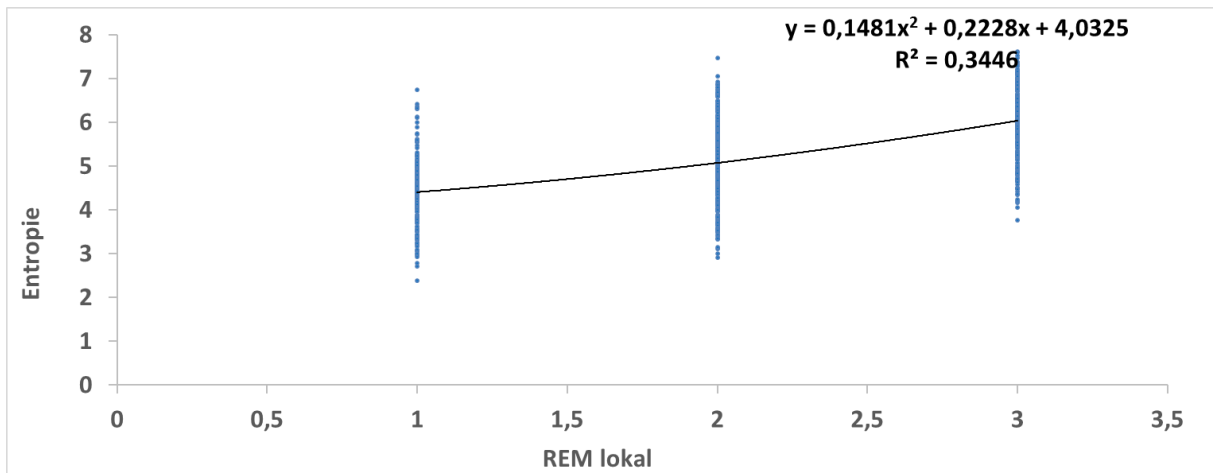
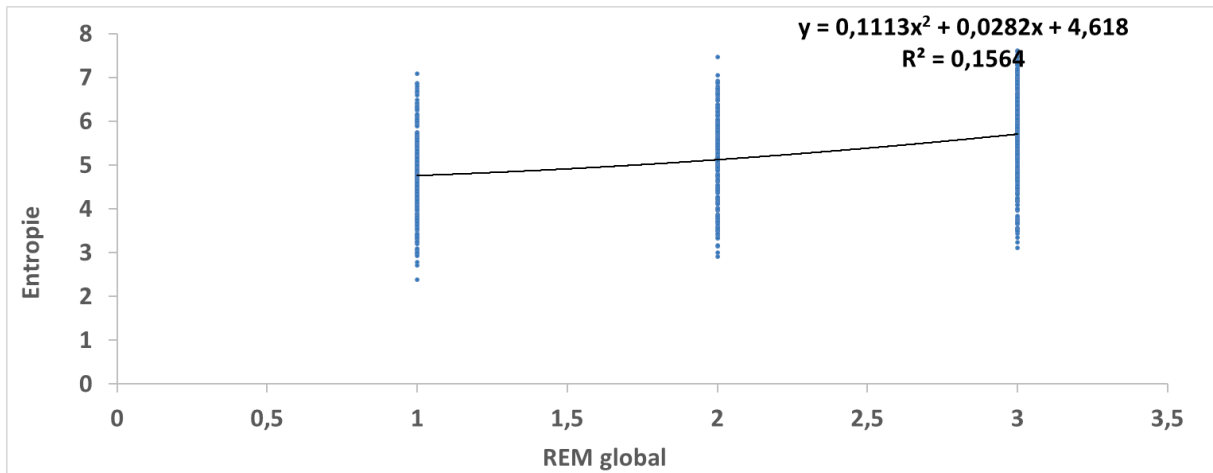


Abb. 111: Punktwolken-Diagramm von Entropie und **REM global** (oben), Entropie und **REM lokal** (mittig) sowie Entropie und makroskopisch-visuell (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der **lokal-Kachel-basierten Analyse**. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

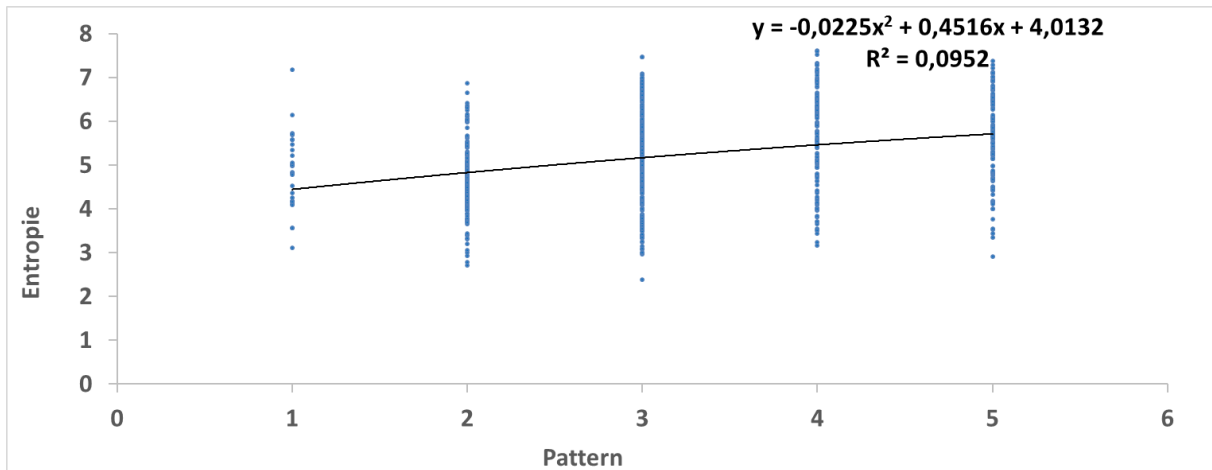


Abb. 112: Punktwolken-Diagramm von Entropie und Pattern als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der **lokal**-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

Von diesen 18 dargestellten **lokalen**, Kachel-basierten Korrelationen (von 20 möglichen) zeigten sich 8 auch in der **globalen**, Proben-basierten Analyse. Diese waren:

- REM-global mit: ASM, IDM, Entropie
- REM-lokal: mit ASM, Correlation, IDM, Entropie
- Pattern mit: Entropie

3.9 Analyse signifikanter Korrelationen zwischen quantitativen Parametern der räumlichen Organisation und den optisch-visuellen Klassifikationen (Scores)

Bei der Korrelations-Analyse der Parameter der räumlichen Organisation mit den optisch-visuell erhobenen Scores zeigten sich deutlich mehr Korrelationen in der lokalen (Kachel-basierten) (35 von 48 = 73%) als in der globalen (Proben-basierten) (13 von 48 = 27%) Betrachtungsweise.

Proben-basierte, globale Pearson-Product-Correlation	REM vis globale Probe	ELMi vis Kachel-basiert	Makroskop. visuell	Pattern
	0,417	0,361	0,208	0,157
MedianNND	0,0851	0,141	0,406	0,533
	18	18	18	18
	-0,275	-0,337	-0,388	0,029
MedianDegree	0,269	0,172	0,112	0,909
	18	18	18	18
	0,425	0,39	0,261	0,186
MWNND	0,0786	0,109	0,295	0,461
	18	18	18	18
	-0,367	-0,38	-0,382	-0,164
MWDegrees	0,134	0,12	0,118	0,515
	18	18	18	18
	0,488	0,457	0,323	0,256
SDofCE	0,0397	0,0565	0,191	0,306
	18	18	18	18
	-0,724	-0,638	-0,238	-0,678
absolute_Zellzahl	0,000684	0,0044	0,342	0,00198
	18	18	18	18
	-0,72	-0,626	-0,279	-0,701
normierte_Zellzahl	0,000747	0,00548	0,262	0,0012
	18	18	18	18
	-0,043	-0,163	-0,328	-0,0369
xPairColMax	0,865	0,519	0,183	0,885
	18	18	18	18
	0,34	0,399	0,316	0,106
PairColMax	0,168	0,101	0,202	0,674
	18	18	18	18
	-0,623	-0,632	-0,34	-0,655
CEwithEdges	0,00575	0,00491	0,168	0,00316
	18	18	18	18
	0,171	0,184	0,4	0,146
MWDegreeNN	0,498	0,464	0,0996	0,564
	18	18	18	18
	0,497	0,52	0,431	0,472
MedianDegreeNN	0,0358	0,027	0,074	0,0481
	18	18	18	18

Tab. 17: Proben-basierte (**globale**) Korrelationsanalyse zwischen den quantitativen Parametern der räumlichen Organisation aus der Fluoreszenzmikroskopischen Analyse und den optisch-visuell erhobenen Scores. (Obere Zahl: Correlation Coefficient, mittlere Zahl: p-Wert, untere Zahl: Anzahl der Proben; Signifikanz grün markiert bei $p < 0,05$)

Kachel-basierte, lokale Pearson-Product-Correlation	REM vis globale Probe	EIMi vis Kachel-basiert	Makroskop. visuell	Pattern
	0,116	0,15	0,0536	0,19
MedianNND	0,00114	0,0000247	0,135	9,26E-08
	781	781	781	781
	-0,0954	-0,0652	-0,136	0,0181
MedianDegree	0,00766	0,0684	0,000143	0,614
	781	781	781	781
	0,15	0,184	0,901	0,228
MWNND	2,51E-05	2,220E-07	0,0117	1,1E-10
	781	781	781	781
	-0,118	-0,0663	-0,124	-0,0785
MWDegrees	0,000932	0,0641	0,000514	0,0283
	781	781	781	781
	0,197	0,229	0,131	0,253
SDofCE	2,69E-08	9,808E-11	0,000229	6,48E-13
	781	781	781	781
	0,358	-0,325	-0,101	-0,295
absolute_Zellzahl	5,82E-25	1,216E-20	0,00493	4,06E-17
	781	781	781	781
	-0,291	-0,268	-0,999	-0,231
normierte_Zellzahl	9,996E-17	2,328E-14	0,0052	6,33E-11
	781	781	781	781
	-0,056	-0,0694	-0,154	-0,00676
xPairColMax	0,118	0,0526	0,000016	0,85
	781	781	781	781
	0,103	0,127	0,0918	0,0697
PairColMax	0,00391	0,000363	0,0103	0,0514
	781	781	781	781
	-0,455	-0,389	-0,229	-0,328
CEwithEdges	2,96E-41	1,078E-29	9,325E-11	4,23E-21
	781	781	781	781
	0,0503	0,023	0,108	0,0452
MWDegreeNN	0,16	0,52	0,00255	0,207
	781	781	781	781
	0,119	0,0613	0,101	0,0662
MedianDegreeNN	0,000882	0,0868	0,00478	0,0643
	781	781	781	781

Tab.18: Kachel-basierte (**lokale**) Korrelationsanalyse zwischen den quantitativen Parametern der räumlichen Organisation aus der Fluoreszenzmikroskopischen Analyse und den optisch-visuell erhobenen Scores. (Obere Zahl: Correlation Coefficient, mittlere Zahl: p-Wert, untere Zahl: Anzahl der Proben; Signifikanz grün markiert bei $p < 0,05$)

Diese Tabelle zeigt, dass alle quantitativen Parameter zur Analyse der räumlichen Organisation mit mindestens einem Score zur Erfassung des strukturellen Schadens der Knorpelproben korrelierten.

Im Folgenden werden daher nun zunächst Kachel-basiert (**lokal**) signifikante Korrelationen zwischen den Parametern der räumlichen Organisation und den optisch-visuellen Scores graphisch inklusive Bestimmtheitsmaß dargestellt. Am Ende der Darstellung erfolgt die Angabe, welche der dargestellten paarweisen Korrelationen auch in der probenbasierten, **globalen** Betrachtungsweise einen signifikanten

Zusammenhang aufwiesen. Auf die graphische Darstellung jener Korrelationsanalysen wurde aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit allerdings verzichtet. Nur die Korrelationen, die in der probenbasierten, aber nicht in der kachelbasierten Betrachtungsweise einen signifikanten Zusammenhang aufwiesen wurden im Anschluss separat graphisch in analoger Weise dargestellt.

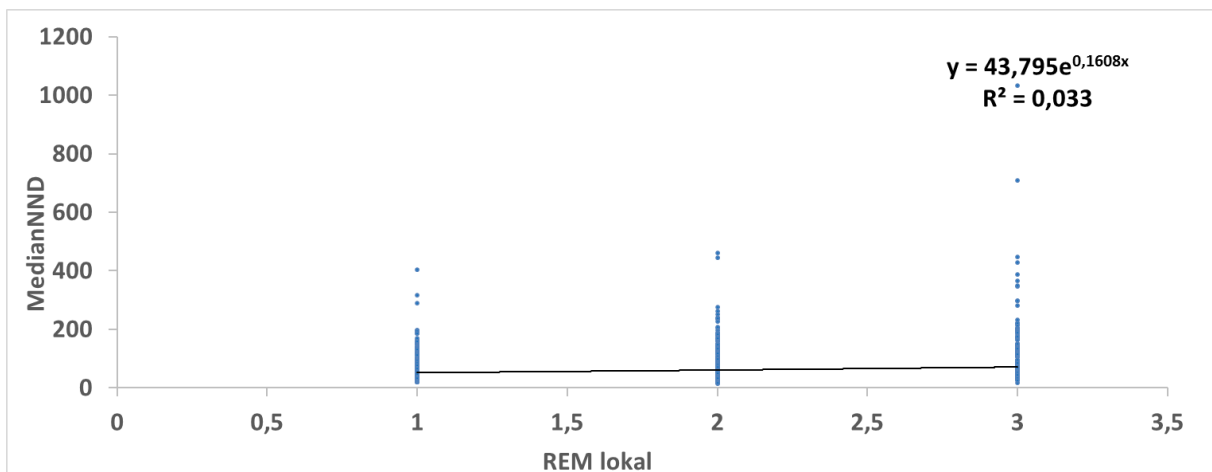
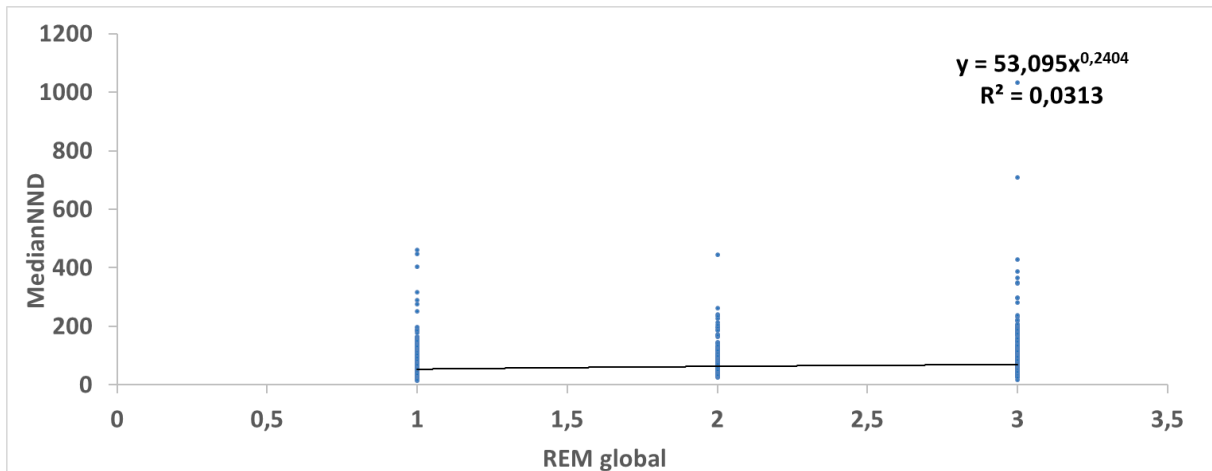


Abb. 113: Punktwolken-Diagramm von MedianNND und REM **global** (oben) sowie MedianNND und REM **lokal** (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

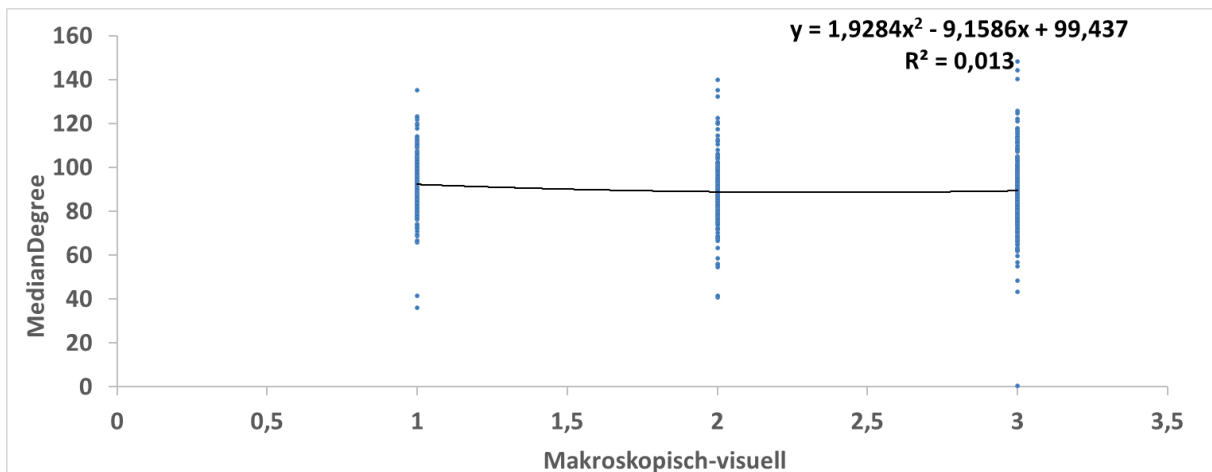
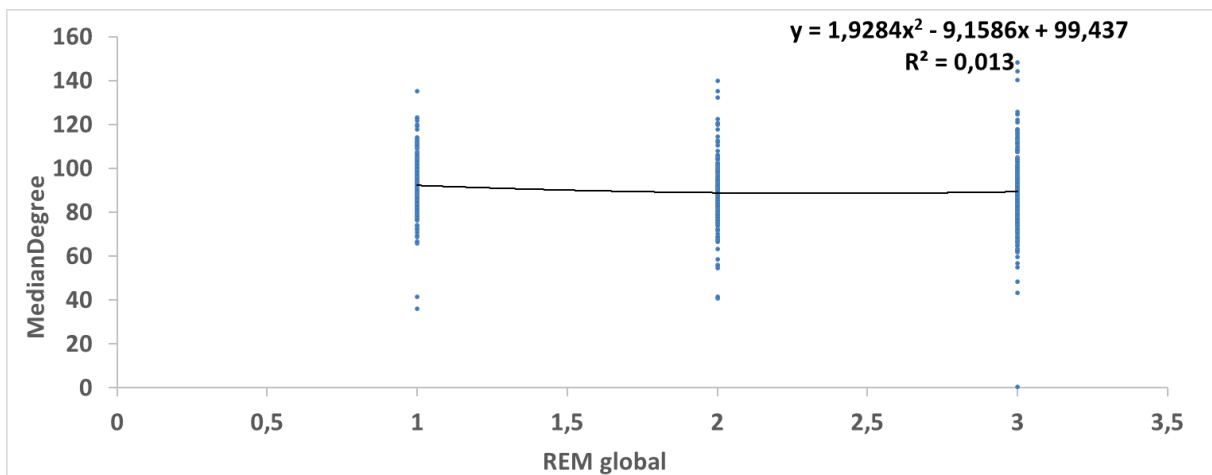
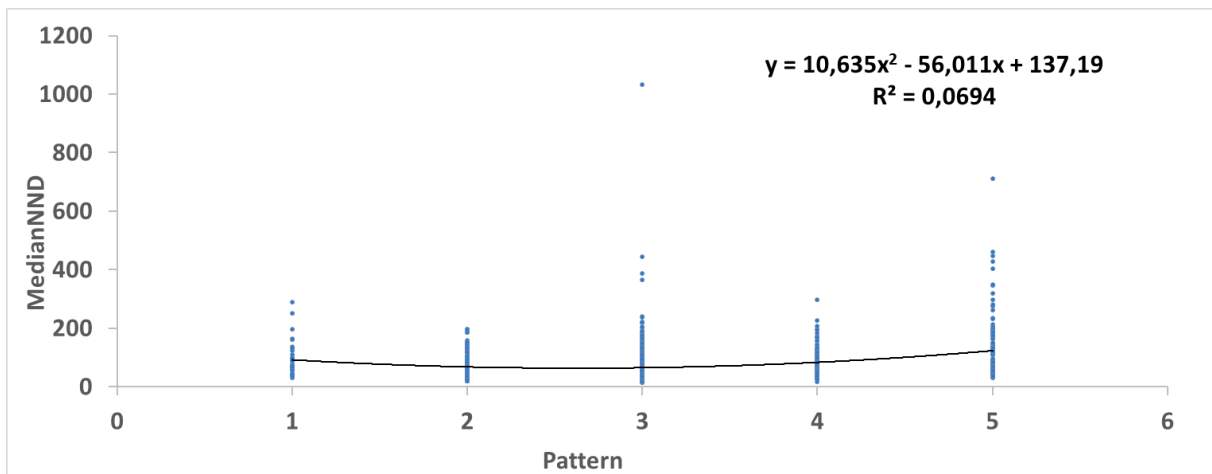


Abb. 114: Punktwolken-Diagramm von MedianNND und Pattern (oben), MedianDegree und REM **global** (mittig) sowie MedianDegree und makroskopisch-visuell (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

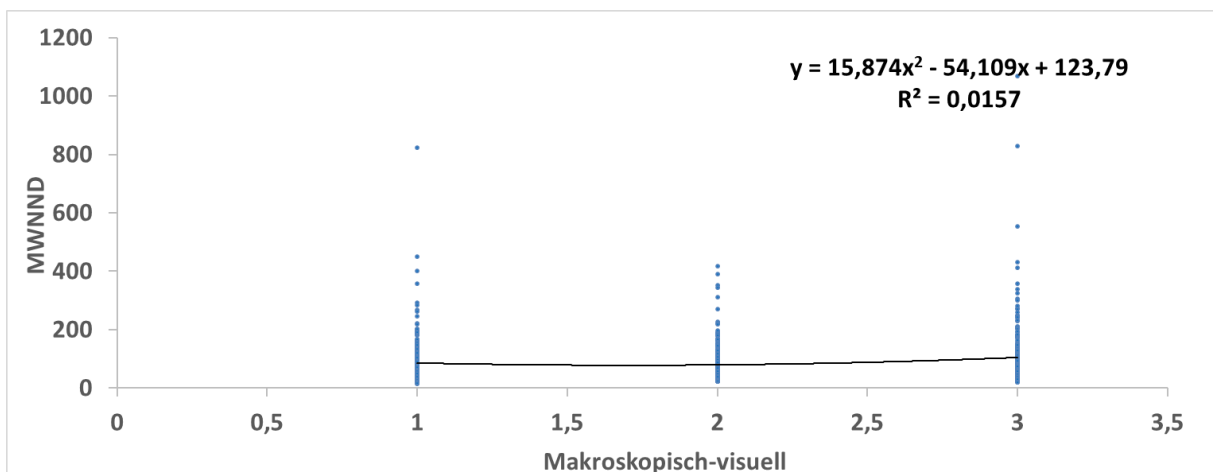
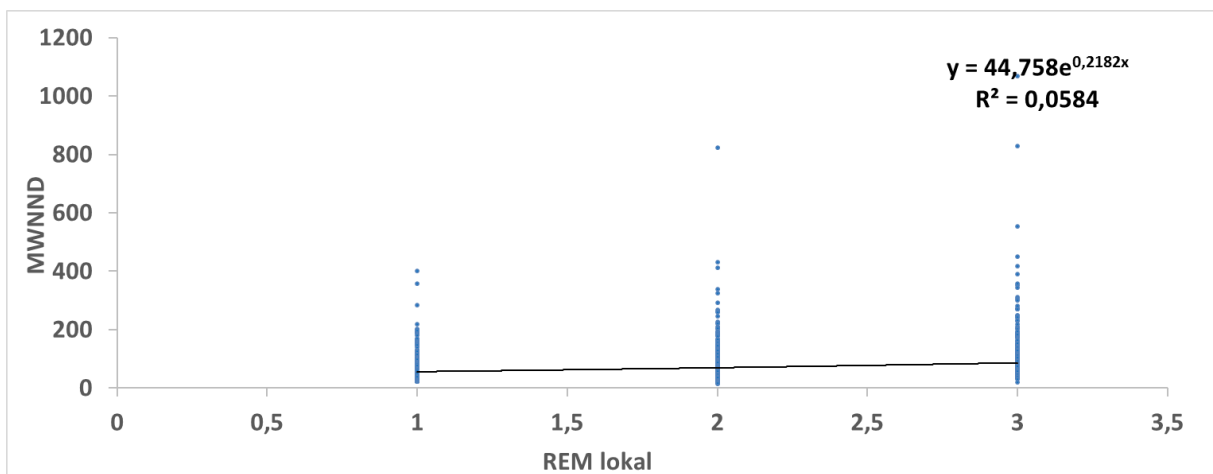
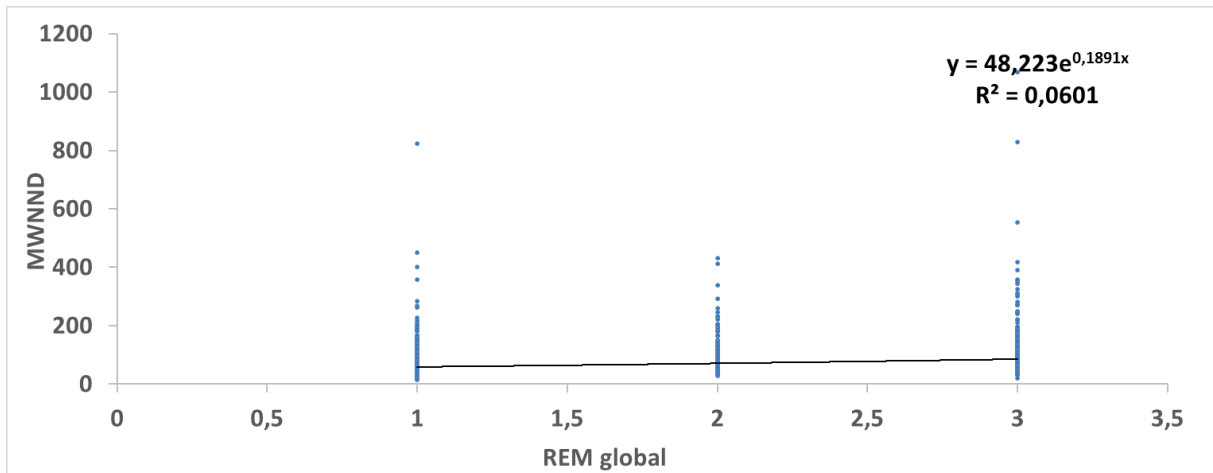


Abb. 115: Punktwolken-Diagramm von MWNND und REM **global** (oben) sowie MWNND und REM-**lokal** (mittig) sowie MWNND und makroskopisch-visuell (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

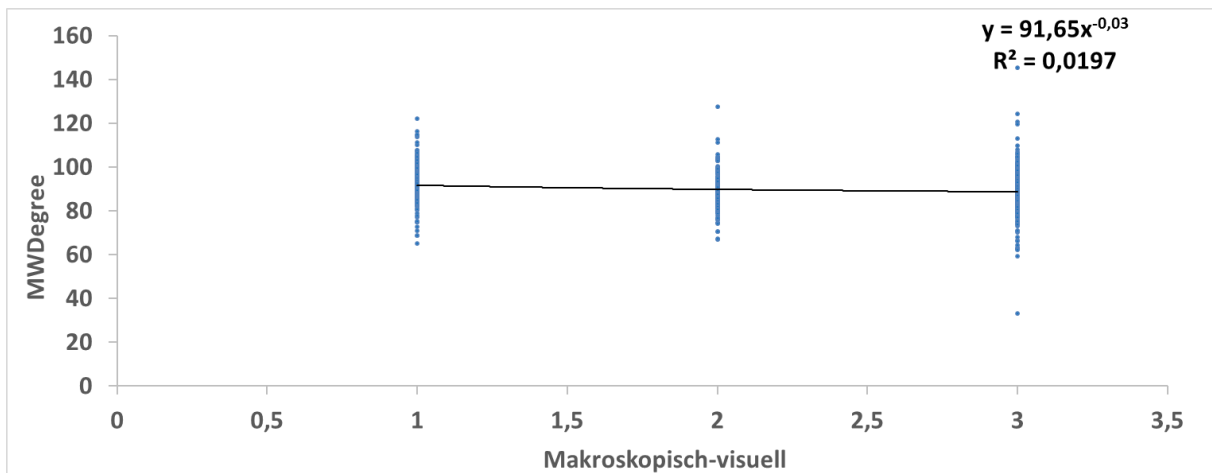
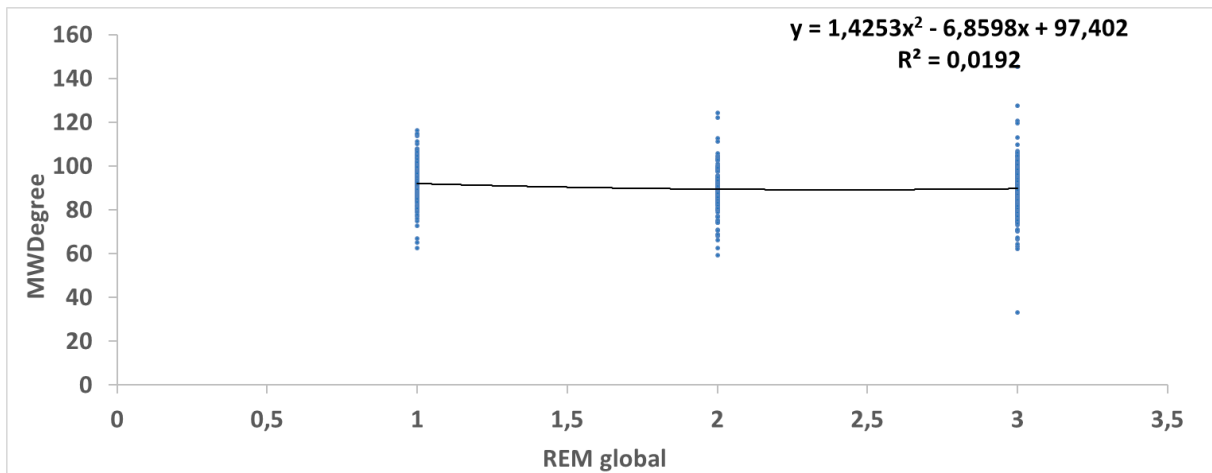
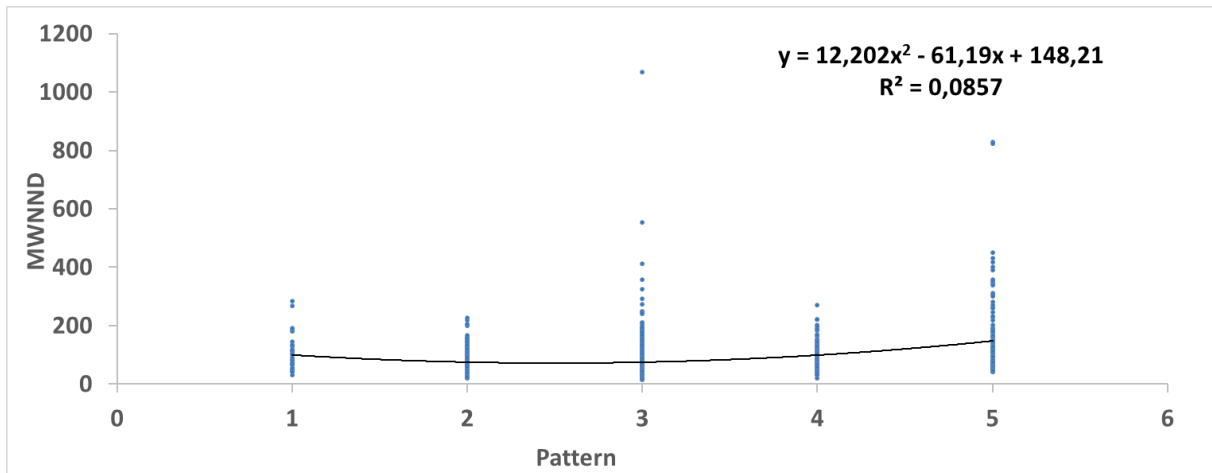


Abb. 116: Punktwolken-Diagramm von MWNND und Pattern (oben), MWDegree und REM **global** (mittig) sowie MWDegree und makroskopisch-visuell (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

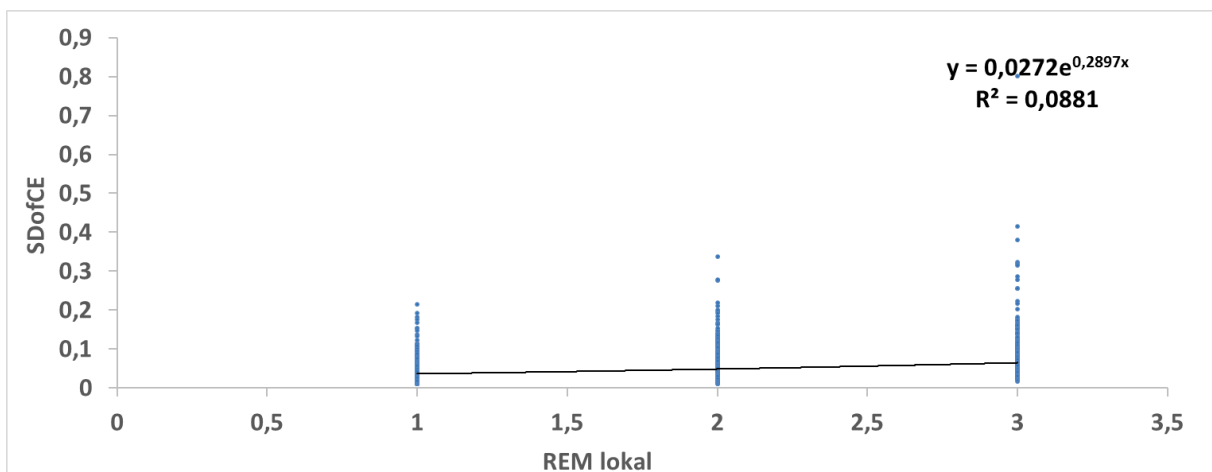
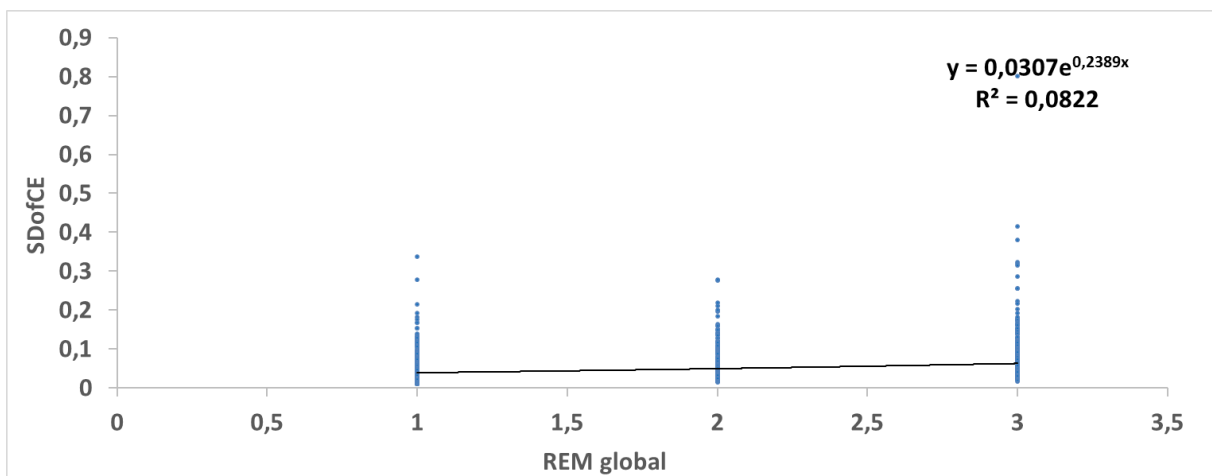
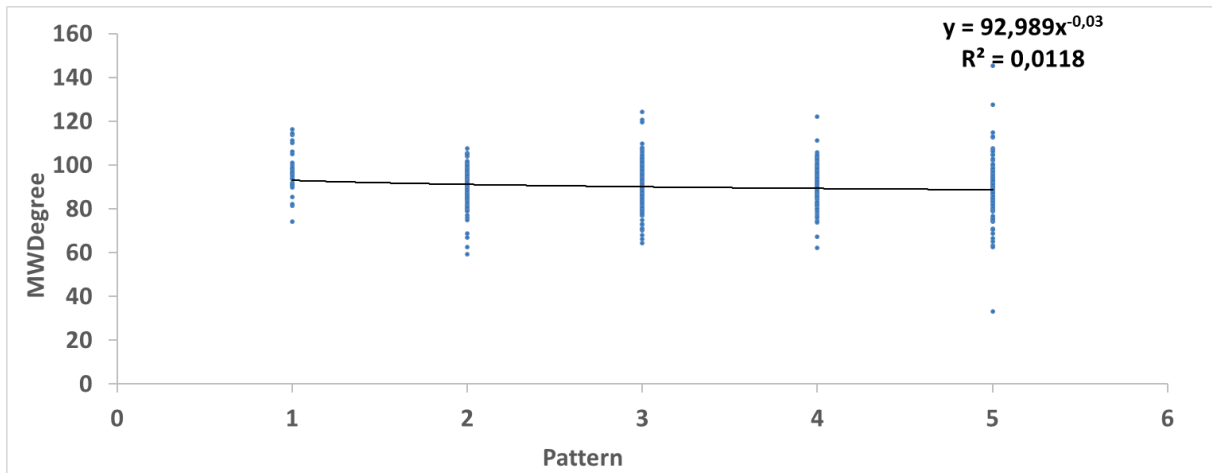


Abb. 117: Punktwolken-Diagramm von MWDegree und Pattern (oben) sowie SDofCE und REM **global** (mittig) sowie SDofCE und REM **lokal** (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

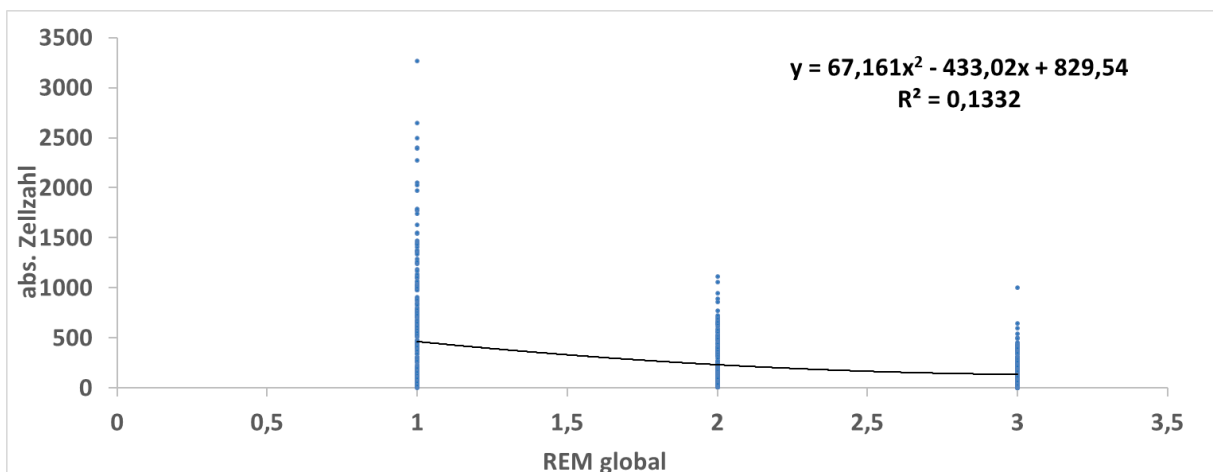
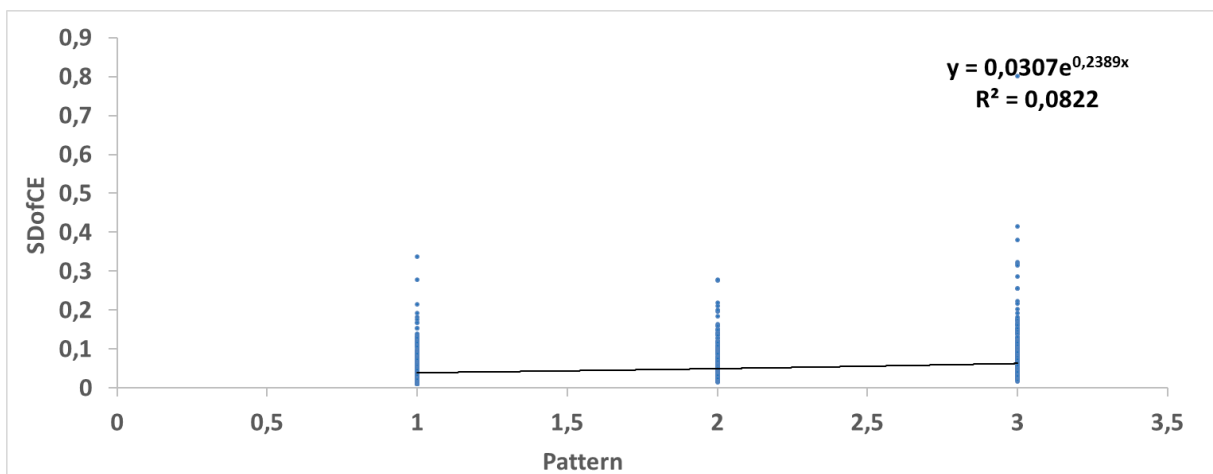
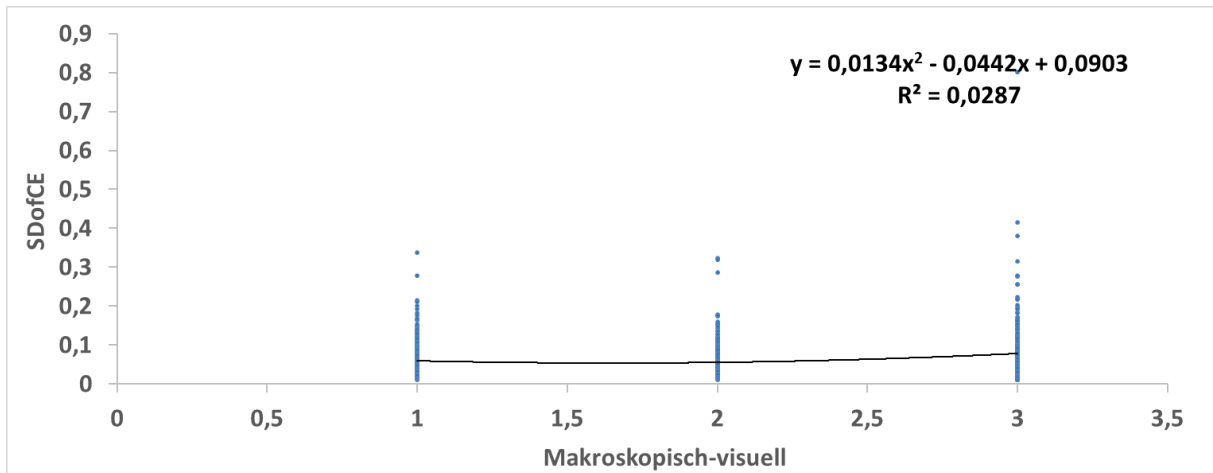


Abb. 118: Punktwolken-Diagramm von *SDofCE* und *makroskopisch-visuell* (oben), *SDofCE* und *Pattern* (mittig) sowie *abs. Zellzahl* und *REM global* (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

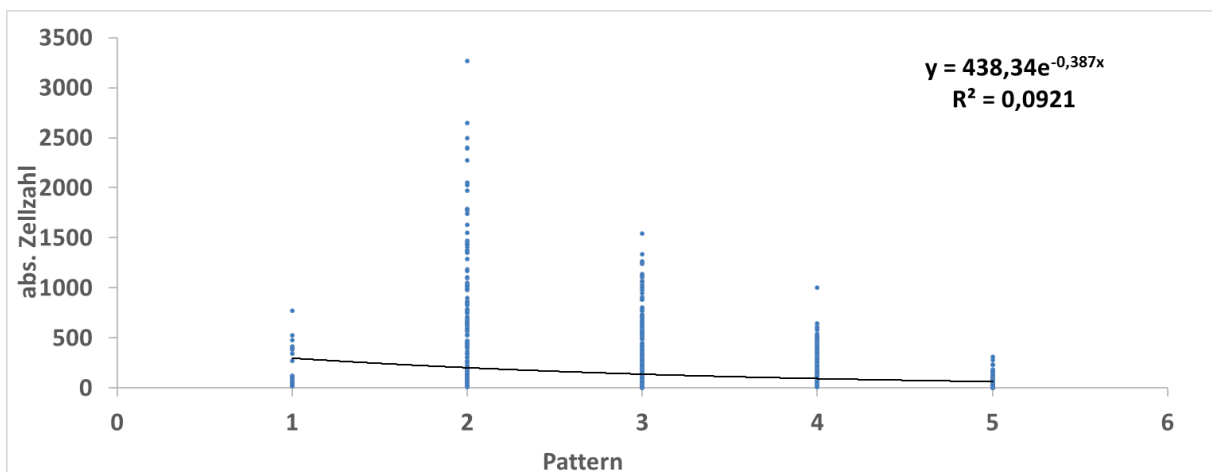
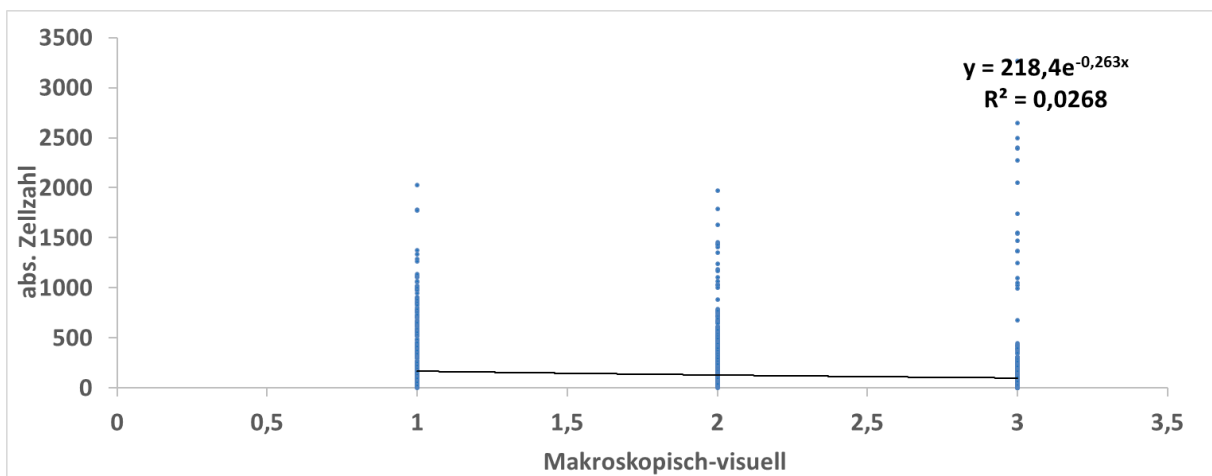
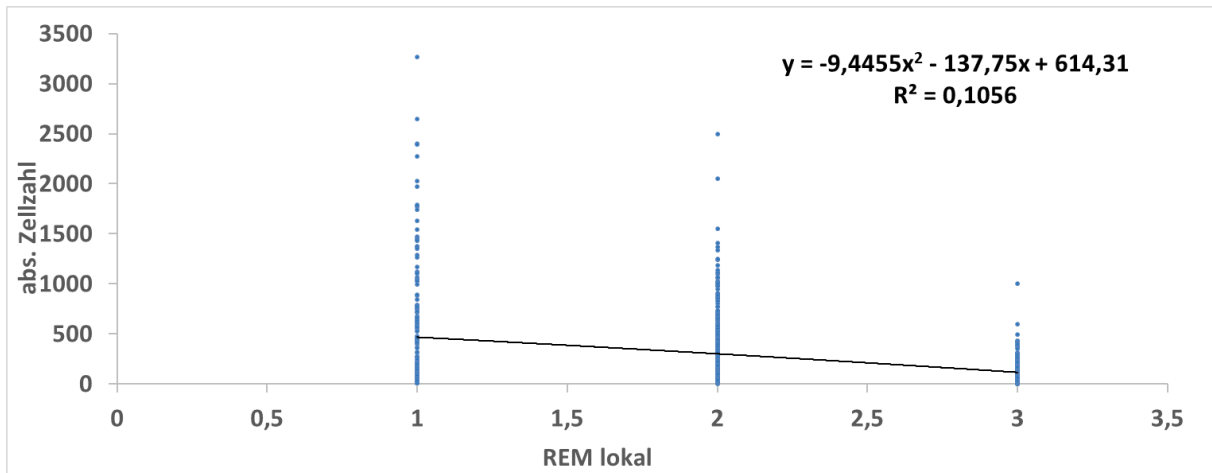


Abb. 119: Punktwolken-Diagramm von abs.Zellzahl und REM **lokal** (oben), abs. Zellzahl und makroskopisch-visuell (mittig) sowie abs.Zellzahl und Pattern (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

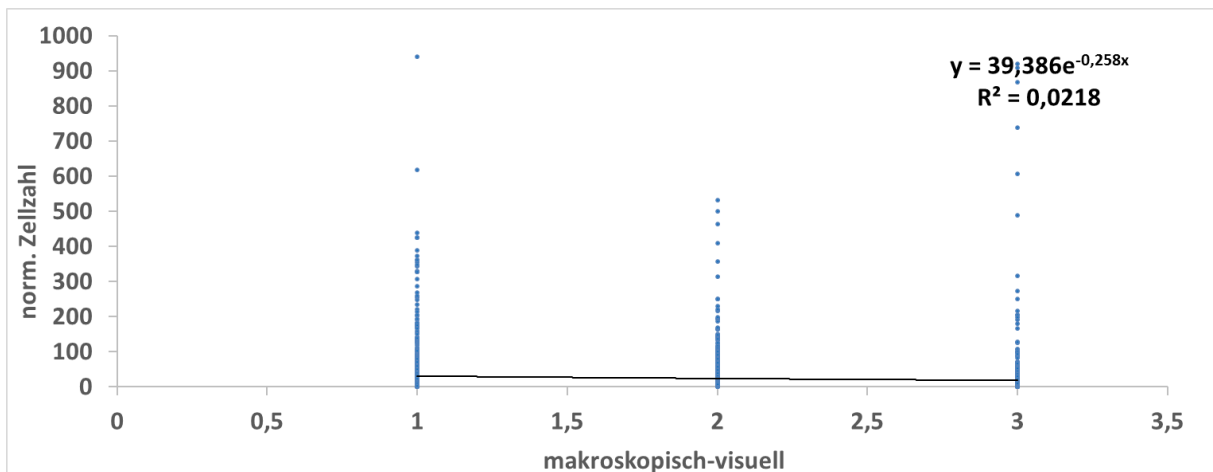
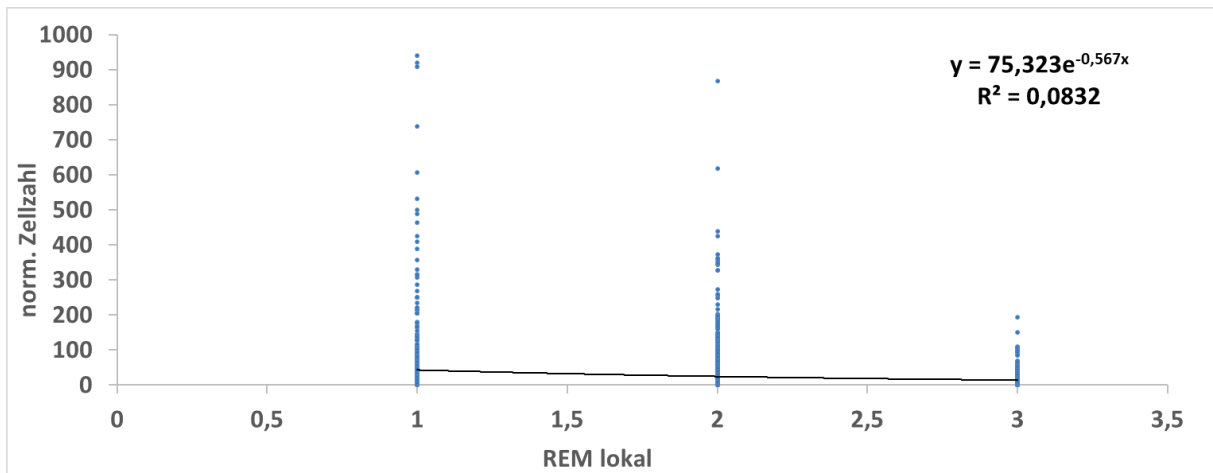
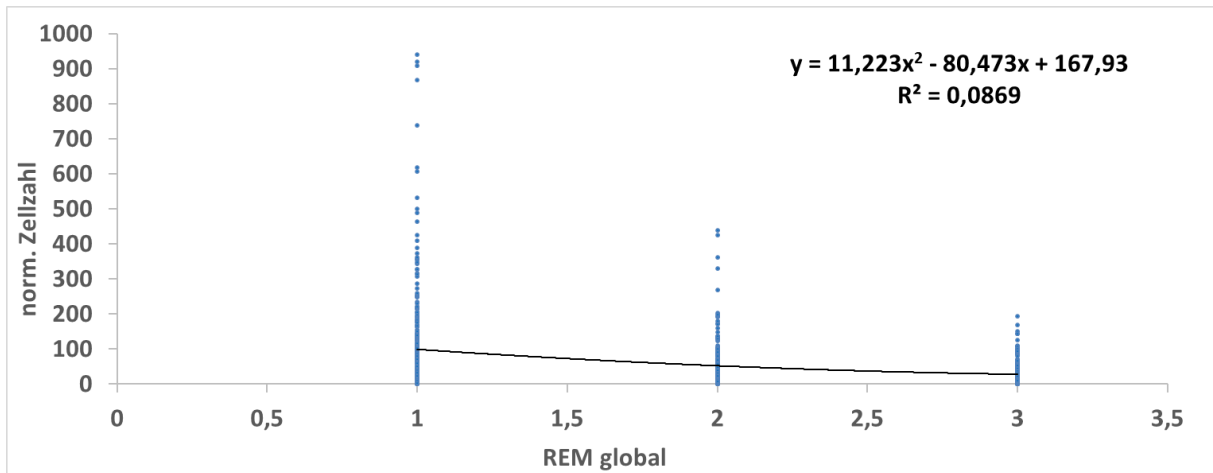


Abb. 120: Punktwolken-Diagramm von norm. Zellzahl und **REM global** (oben), norm.Zellzahl und **REM lokal** (mittig) sowie norm. Zellzahl und makroskopisch-visuell (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

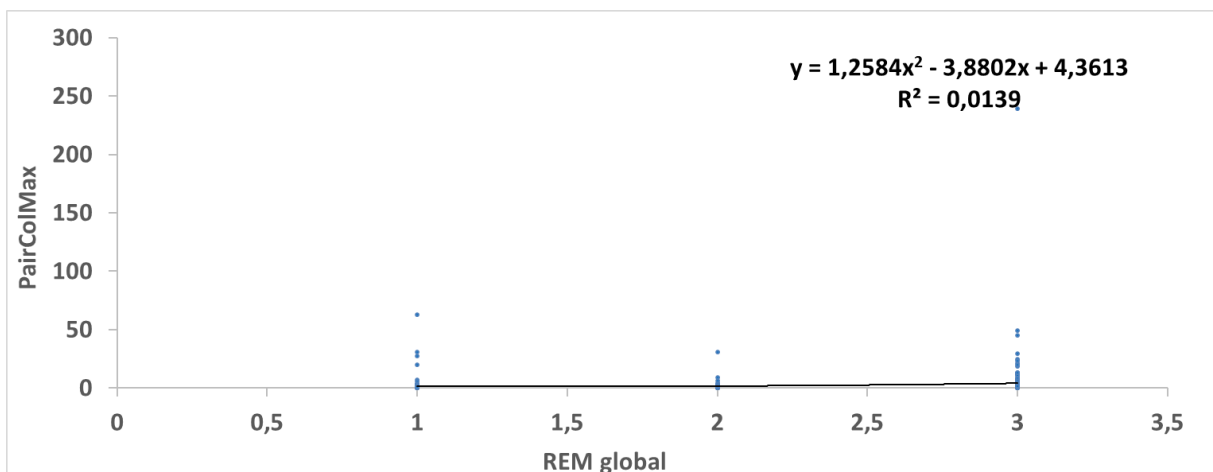
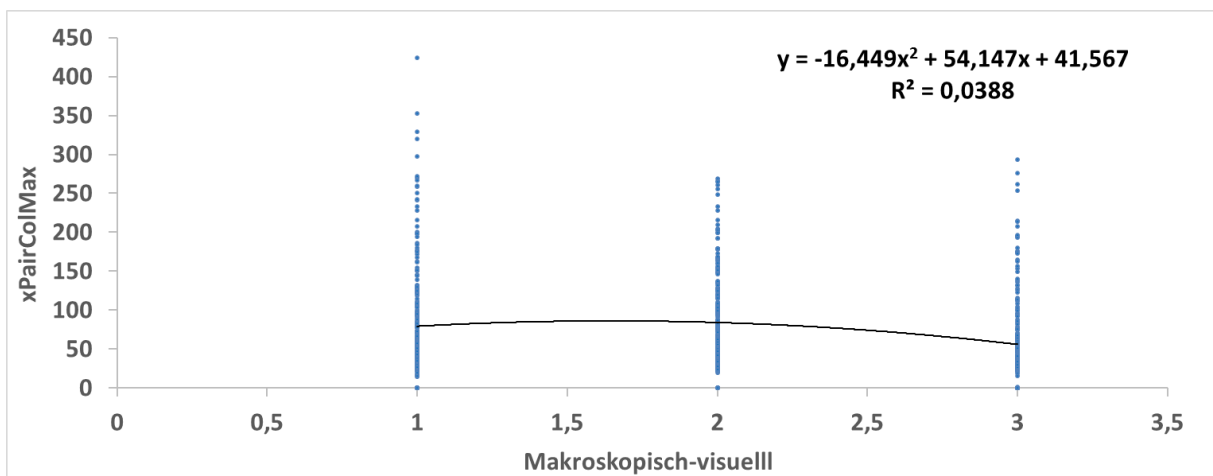
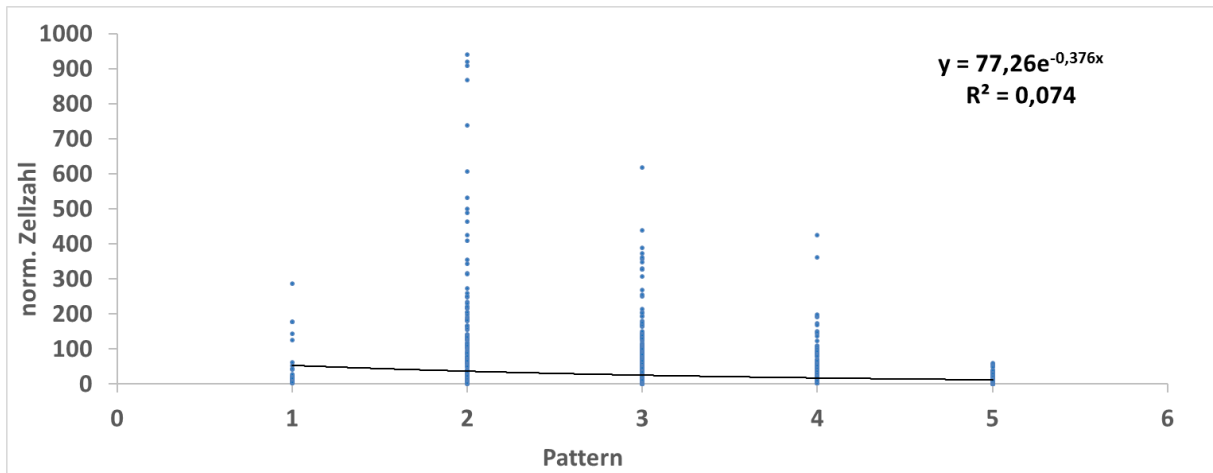


Abb. 121: Punktwolken-Diagramm von norm.Zellzahl und Pattern (oben), xPairColMax und makroskopisch-visuell (mittig) sowie PairColMax und REM **global** (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

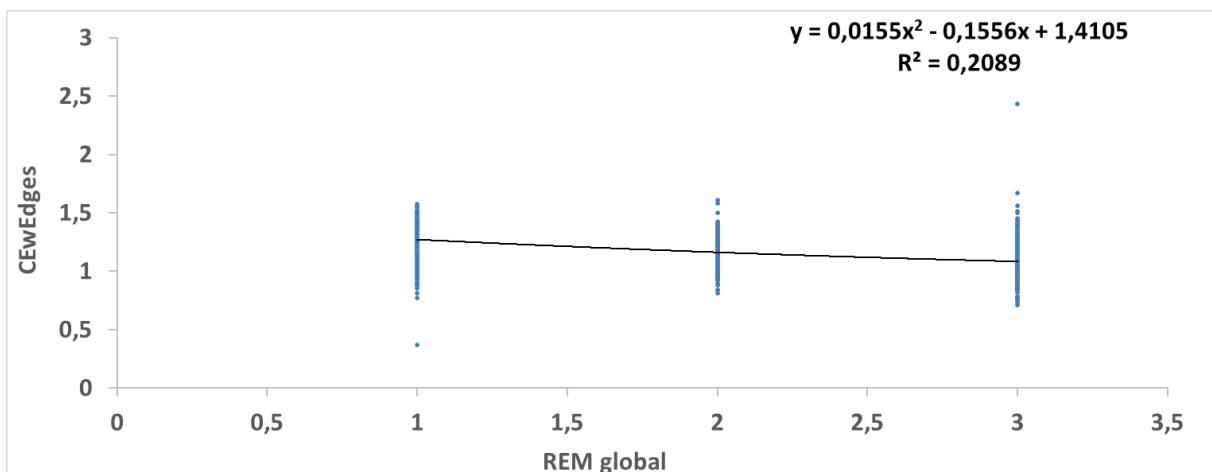
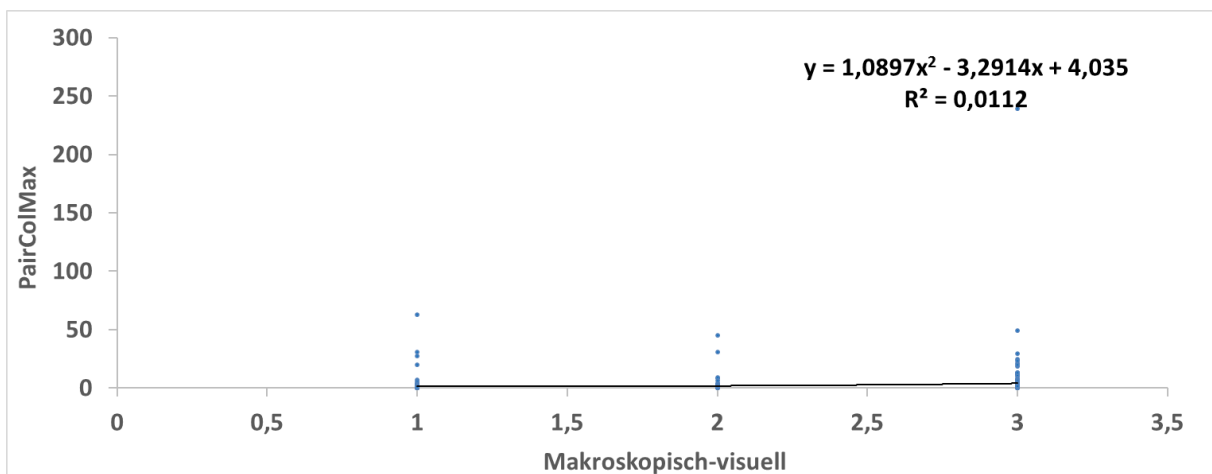
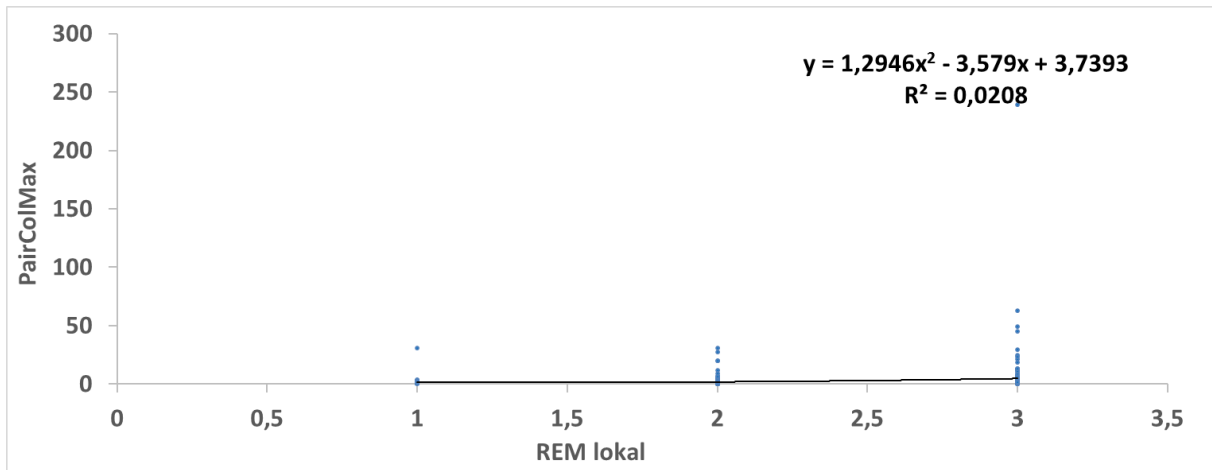


Abb. 122: Punktwolken-Diagramm von PairColMax und REM **lokal** (oben), PairColMax und makroskopisch-visuell (mittig) sowie CEwEdges und REM **global** (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

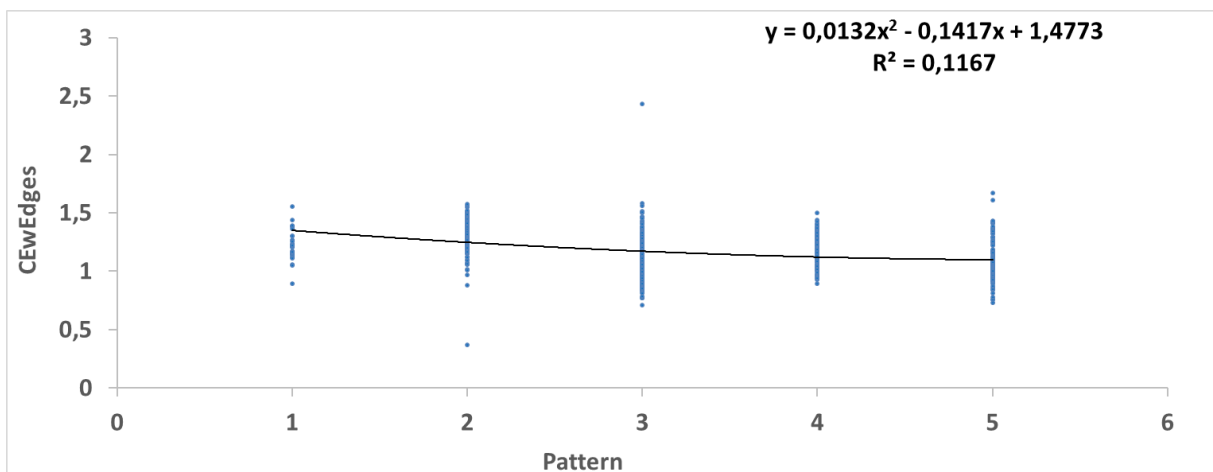
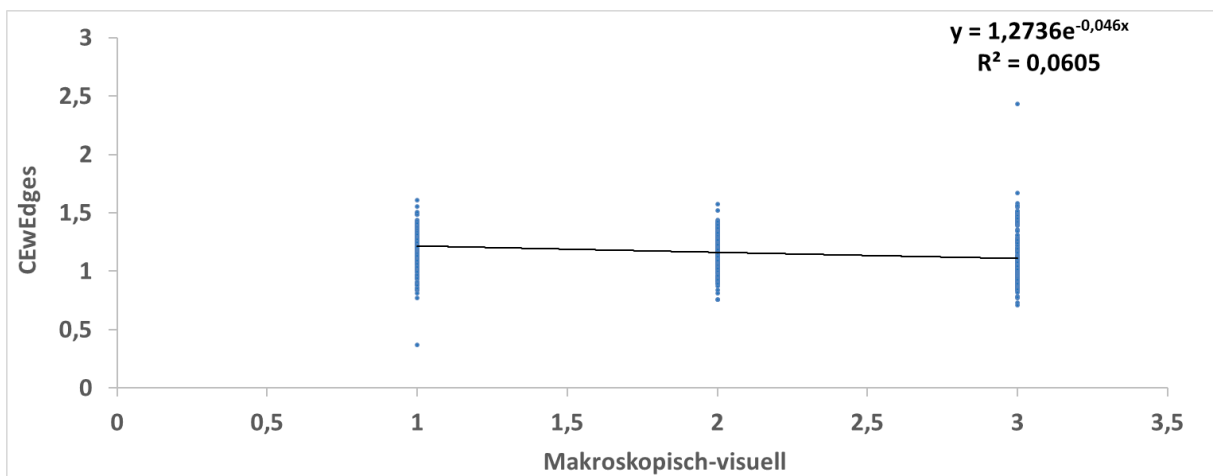
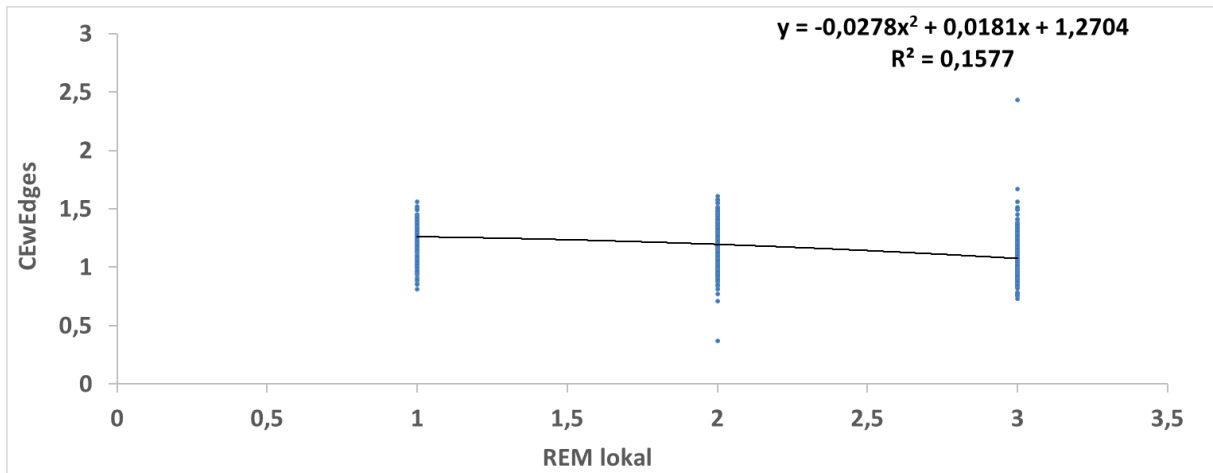


Abb. 123: Punktwolken-Diagramm von CEwEdges und REM **lokal** (oben), CEwEdges und makroskopisch-visuell (mittig) sowie CEwEdges und Pattern (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

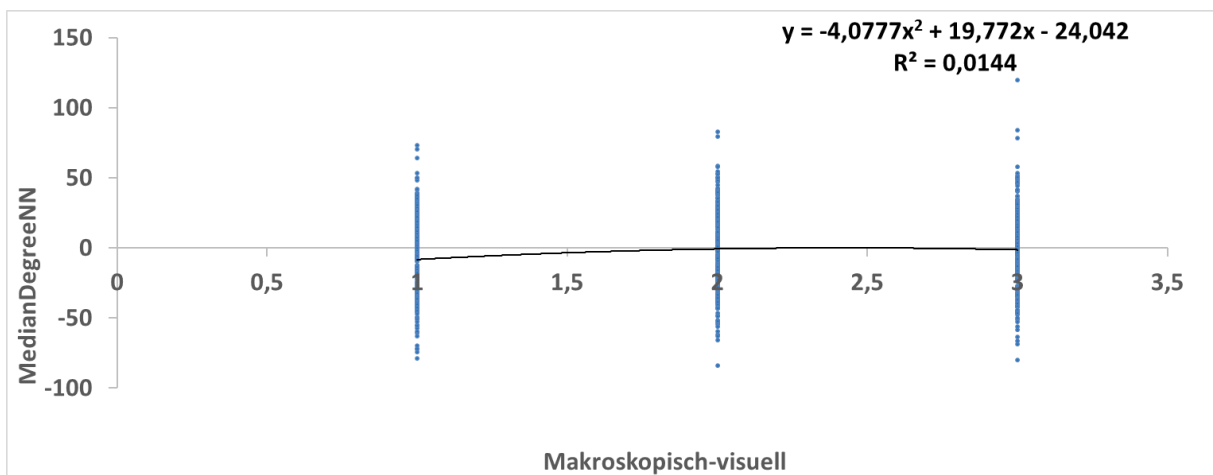
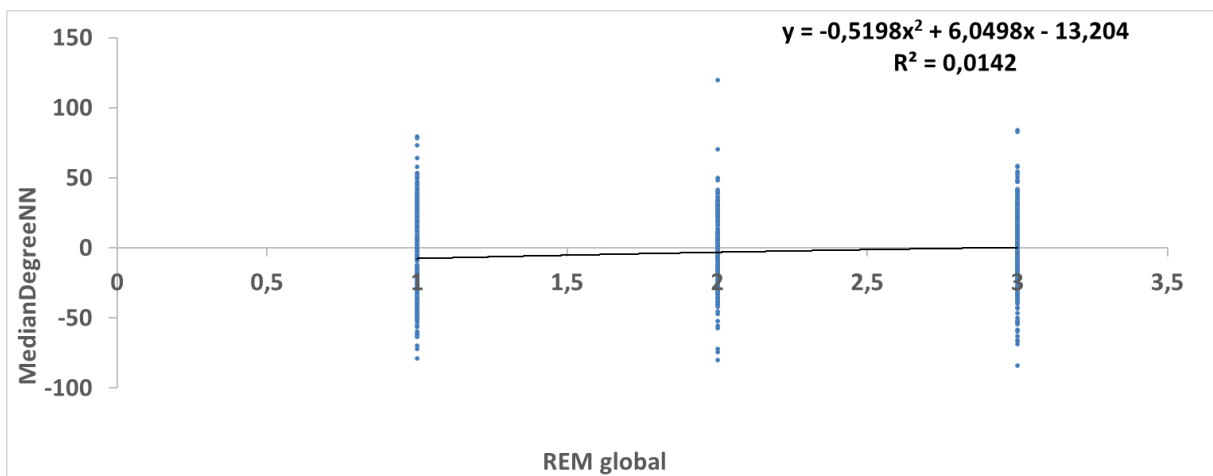
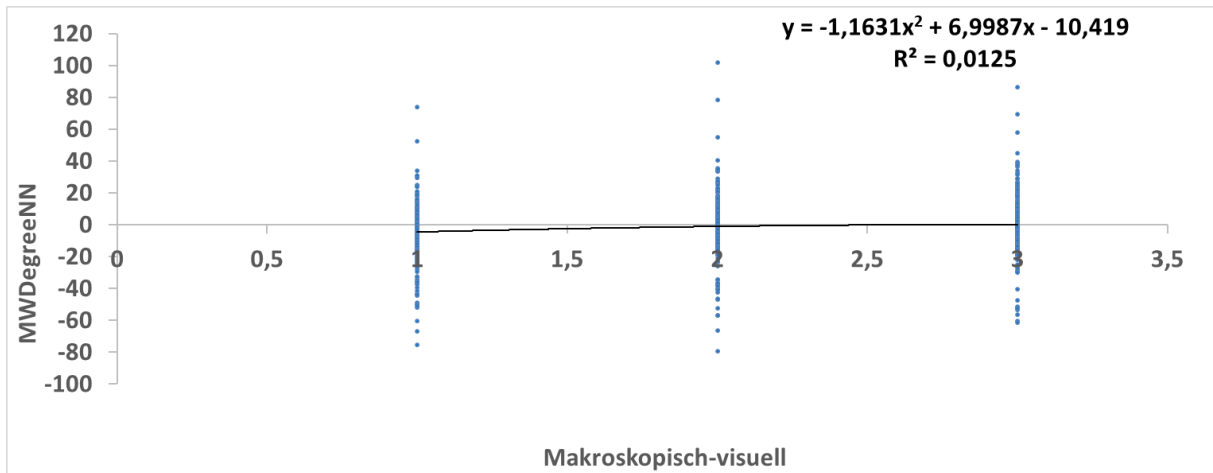


Abb. 124: Punktwolken-Diagramm MWDegreeNN und makroskopisch-visuell (oben), MedianDegreeNN und REM **global** (mittig) sowie MedianDegreeNN und makroskopisch-visuell (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

Von diesen 35 dargestellten **lokalen**, Kachel-basierten Korrelationen (von 48 möglichen) zeigten sich 11 auch in der **globalen**, Proben-basierten Analyse. Diese waren:

- REM-global mit: SDofCE, abs.Zellzahl, norm.Zellzahl, CEwEdges, MedianDegreeNN
- REM-lokal mit; abs.Zellzahl, norm.Zellzahl, CEwEdges
- Pattern mit abs.Zellzahl, norm.Zellzahl, CEwEdges

Im Übrigen fanden sich die im Folgenden dargestellten zwei Korrelationen in der **global**-Proben-basierten, aber nicht in der **lokal**, Kachel-basierten Analyse.

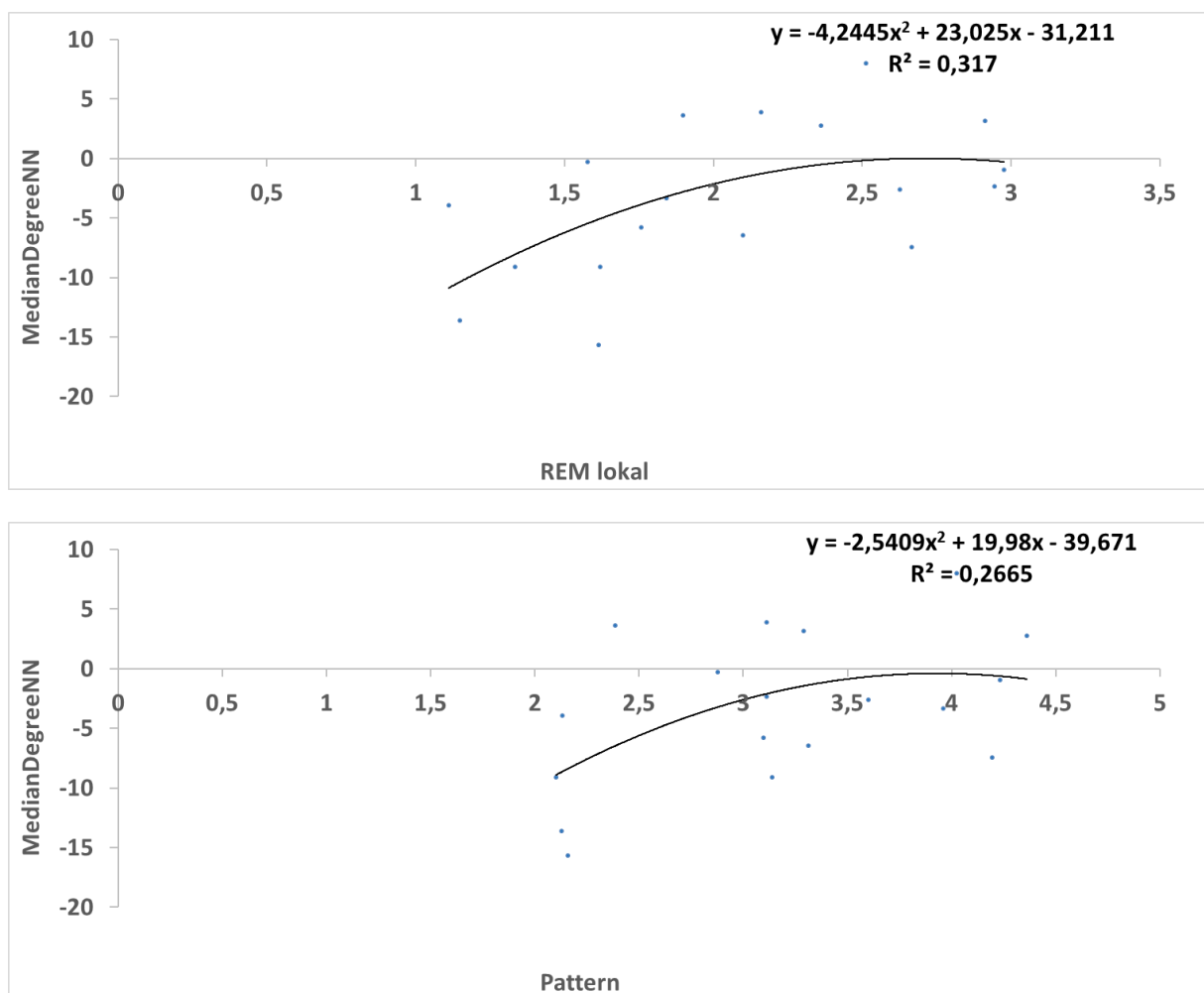


Abb. 125: Punktwolken-Diagramm MedianDegreeNN und REM **lokal** (oben) sowie MedianDegreeNN und Pattern (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der **lokal**-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

Insgesamt zeigt dies, dass die quantitativen Parameter, die für die Analyse der räumlichen Organisation verwendet wurden, mit den verwendeten Scores zur Erfassung des strukturellen Schadens korrelierten.

3.10 Analyse signifikanter Korrelationen zwischen der Texturanalyse der REM-Bilder und quantitativen Parametern der räumlichen Organisation

Im vorangehenden Kapitel wurde dargestellt, dass die quantitativen Parameter der räumlichen Organisation mit dem strukturellen Schadensausmaß der Oberfläche korrelierte. Im Folgenden wurde die Texturanalyse der REM-Bilder verwendet, um das Schadensausmaß nicht durch eine subjektive Einteilung, sondern durch eine quantitative Analyse zu erfassen. Hier war das Ziel zu beantworten, ob in einer globalen vs. lokalen Analyse die räumliche Organisation mit dem texturanalytisch erfassten Schaden korreliert, und wenn ja, welche Parameter diese Korrelation aufweisen.

Bei der Korrelations-Analyse der bei der Texturanalyse der REM-Bilder erhobenen Parameter mit den Parametern der räumlichen Organisation zeigten sich ausschließlich Korrelationen in der lokalen (Kachel-basierten) (21 von 60 = 35%), aber keine in der globalen (Proben-basierten) (0 von 60 = 0%) Betrachtungsweise.

Proben-basierte, globale Pearson-Product-Correlation	MedianNN D	Median Degree	MWNNND	MWDegree	SDofCE	abs.Zellzahl	norm. Zellzahl	xPairCol Max	PairCol Max	CEwEdges	MWDegree NN	Median DegreeNN
	0,118	0,243	0,105	0,318	0,0363	0,166	0,185	0,206	-0,125	0,206	-0,224	-0,445
Angular Second Moment	0,64	0,332	0,679	0,198	0,886	0,511	0,463	0,413	0,622	0,411	0,371	0,0643
	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
	-0,294	0,0225	-0,255	-0,0137	-0,141	-0,0038	-0,0432	-0,401	0,0988	-0,0974	0,124	0,224
Contrast	0,237	0,93	0,308	0,957	0,578	0,988	0,865	0,0987	0,697	0,701	0,625	0,372
	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
	0,232	0,242	0,276	0,329	0,237	-0,102	-0,0894	0,0084	-0,00581	-0,059	-0,138	-0,272
Correlation	0,355	0,334	0,268	0,183	0,343	0,686	0,724	0,974	0,982	0,816	0,585	0,275
	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
	0,222	0,00576	0,182	0,0796	0,0622	0,175	0,176	0,301	-0,102	0,295	-0,312	-0,455
Inverse Difference Moment	0,376	0,982	0,469	0,754	0,806	0,488	0,485	0,225	0,688	0,234	0,208	0,058
	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
	-0,0299	-0,0773	-0,00746	-0,134	0,0585	-0,291	-0,313	-0,217	0,199	-0,303	0,203	0,396
Entropy	0,906	0,76	0,977	0,596	0,818	0,242	0,205	0,386	0,429	0,221	0,419	0,104
	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18

Tab. 19: Proben-basierte (**globale**) Korrelationsanalyse zwischen den Parametern der Texturanalyse der REM-Bilder und den quantitativen Parametern der räumlichen Organisation aus der Fluoreszenzmikroskopischen Analyse. (Obere Zahl: Correlation Coefficient, mittlere Zahl: p-Wert, untere Zahl: Anzahl der Proben; Signifikanz grün markiert bei $p < 0,05$)

Kachel-basierte, lokale Pearson-Product-Correlation	MedianNN D	Median Degree	MWNNND	MWDegree	SDofCE	abs.Zellzahl	norm. Zellzahl	xPairCol Max	PairCol Max	CEwEdges	MWDegree NN	Median DegreeNN
	-0,0751	-0,00519	-0,0764	0,00292	-0,0939	0,0907	0,143	0,00141	-0,0494	0,0881	0,0141	-0,0237
Angular Second Moment	0,0358	0,885	0,0328	0,935	0,00865	0,0112	0,0000635	0,969	0,168	0,0138	0,695	0,508
	781	781	781	781	781	781	781	781	781	781	781	781
	0,0388	0,0351	0,0389	0,0194	0,112	-0,115	-0,123	-0,0728	-0,00619	-0,015	0,00185	0,0148
Contrast	0,278	0,327	0,278	0,588	0,00175	0,00123	0,000589	0,042	0,863	0,675	0,959	0,68
	781	781	781	781	781	781	781	781	781	781	781	781
	-0,0393	-0,0329	-0,0257	-0,0198	-0,0282	0,0325	0,089	-0,0614	-0,0279	-0,00426	0,0119	-0,0191
Correlation	0,273	0,358	0,473	0,58	0,431	0,364	0,0129	0,0865	0,437	0,905	0,741	0,595
	781	781	781	781	781	781	781	781	781	781	781	781
	0,173	-0,016	0,156	-0,00586	0,121	-0,0369	-0,00785	0,23	0,059	0,241	-0,0663	-0,0518
Inverse Difference Moment	0,00000115	0,655	0,0000114	0,87	0,00074	0,303	0,827	7,816E-11	0,0997	9,041E-12	0,064	0,148
	781	781	781	781	781	781	781	781	781	781	781	781
	0,0686	0,0114	0,0806	0,00327	0,0972	-0,138	-0,162	-0,033	0,0563	-0,162	0,00913	0,0353
Entropy	0,0552	0,75	0,0243	0,927	0,00657	0,000107	0,0000566	0,356	0,116	0,00000554	0,799	0,324
	781	781	781	781	781	781	781	781	781	781	781	781

Tab. 20: Kachel-basierte (lokale) Korrelationsanalyse zwischen den Parametern der Texturanalyse der REM-Bilder und den quantitativen Parametern der räumlichen Organisation aus der Fluoreszenzmikroskopischen Analyse und den optisch-visuell erhobenen Scores. (Obere Zahl: Correlation Coefficient, mittlere Zahl: p-Wert, untere Zahl: Anzahl der Proben; Signifikanz grün markiert bei $p < 0,05$)

Im Folgenden wurden daher nun Kachel-basiert (lokal) signifikante Korrelationen zwischen den in der Texturanalyse der rasterelektronenmikroskopischen Bilder erhobenen Parametern und den Parametern der räumlichen Organisation graphisch inklusive Bestimmtheitsmaß dargestellt.

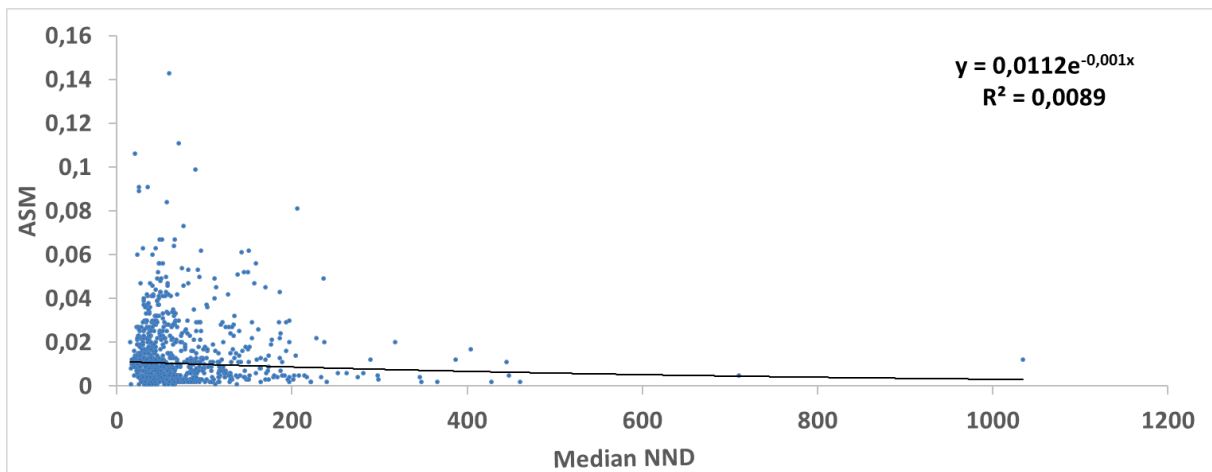


Abb. 126: Punktwolken-Diagramm von ASM und MedianNND als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

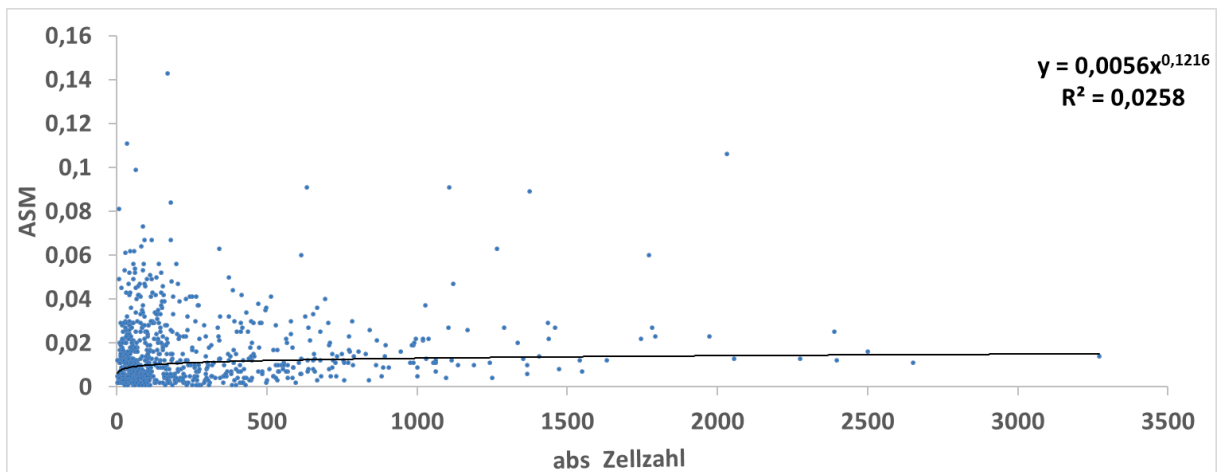
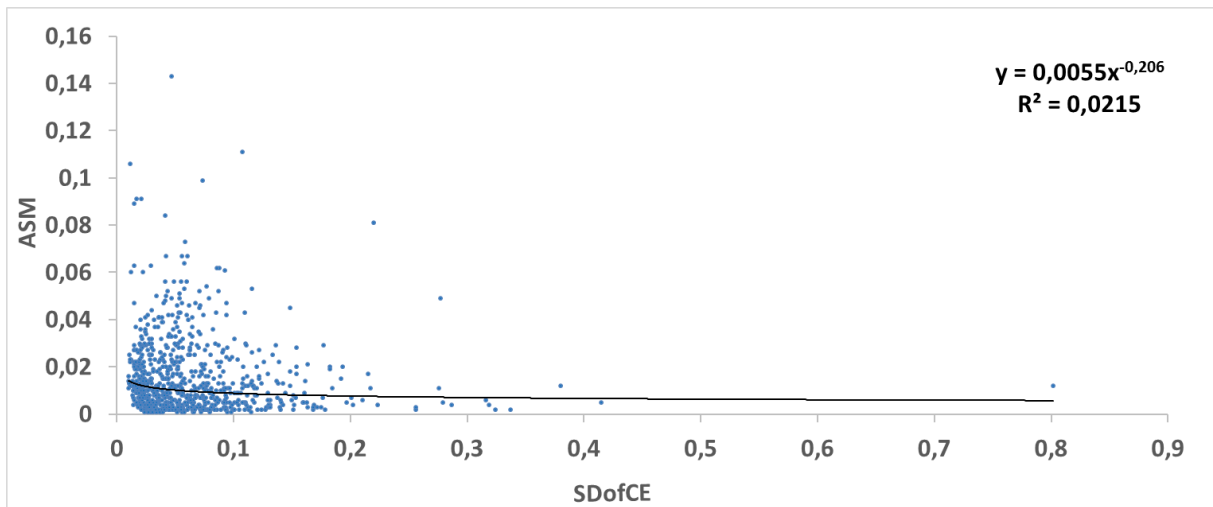
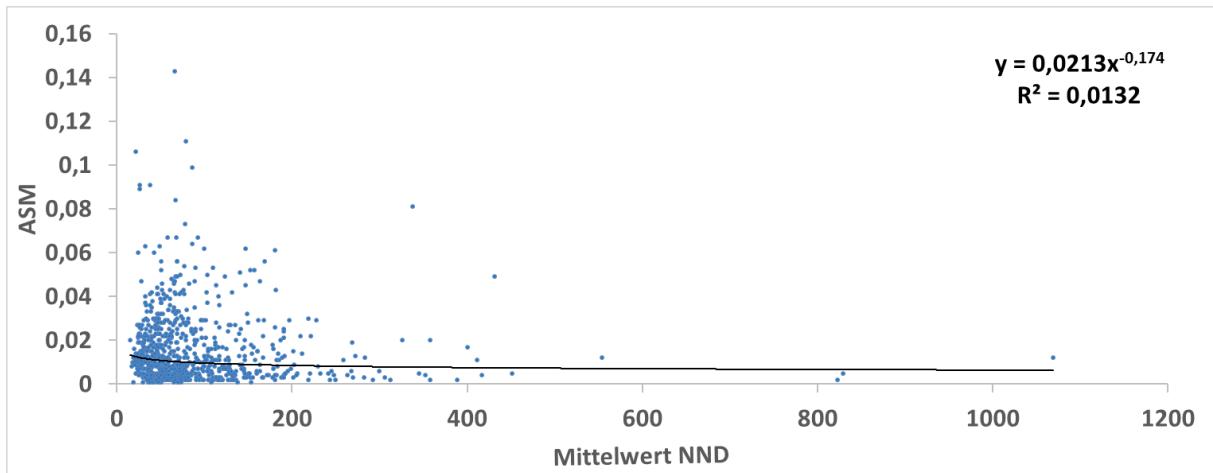


Abb. 127: Punktwolken-Diagramm von ASM mit MittelwertNND (oben), ASM und SDofCE (mittig) sowie ASM mit abs.Zellzahl (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

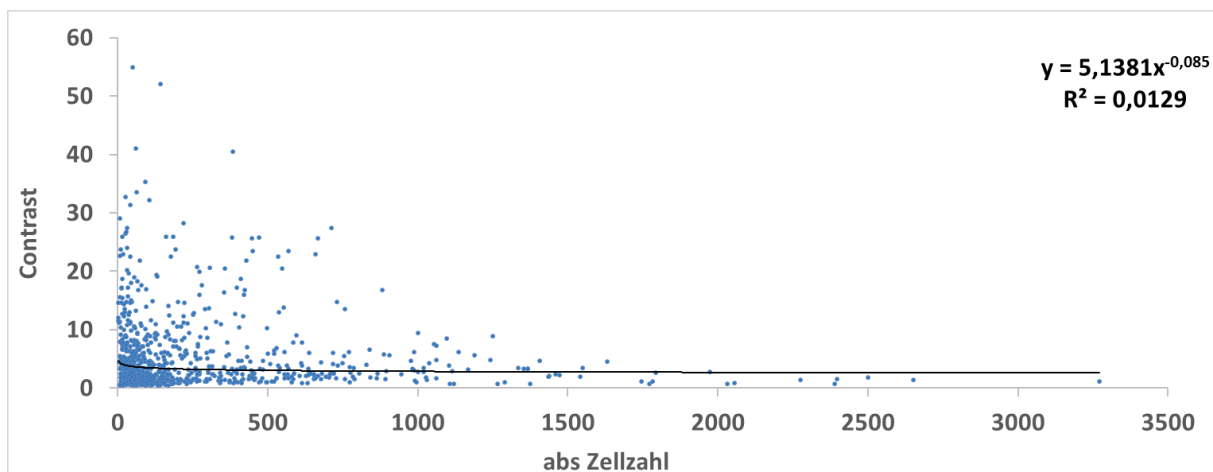
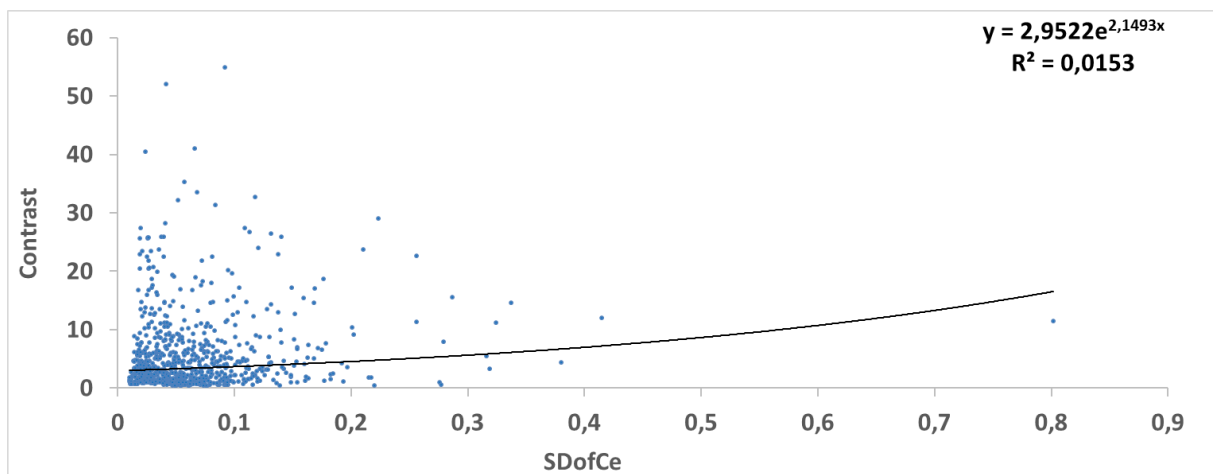
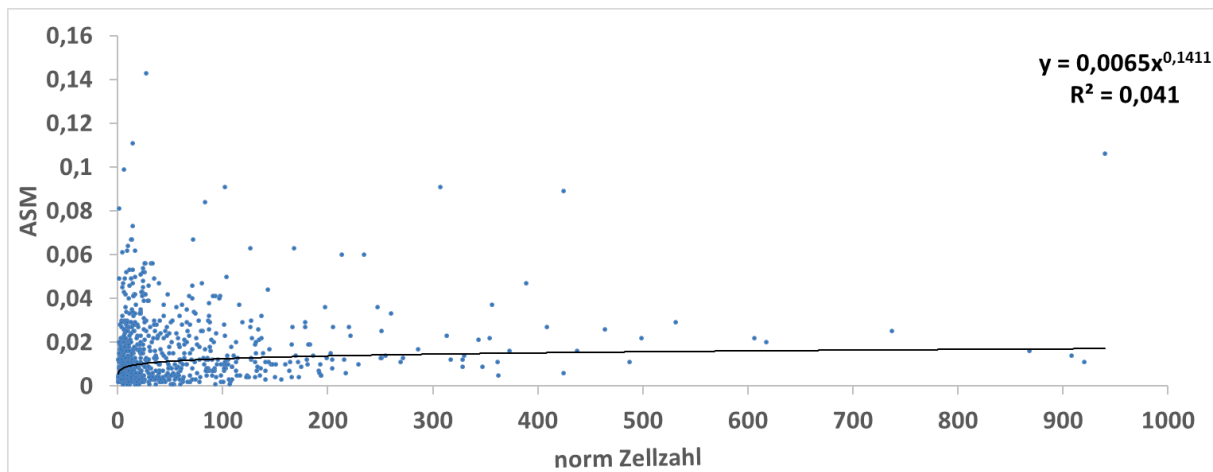


Abb. 128: Punktwolken-Diagramm von Contrast mit ASM und norm.Zellzahl (oben), SDofCE (mittig) sowie Contrast und abs.Zellzahl (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

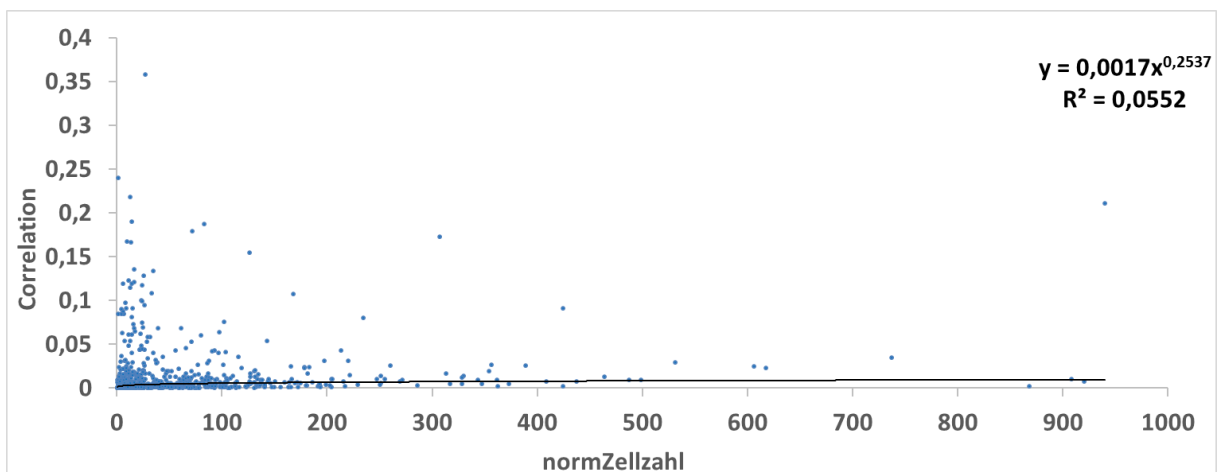
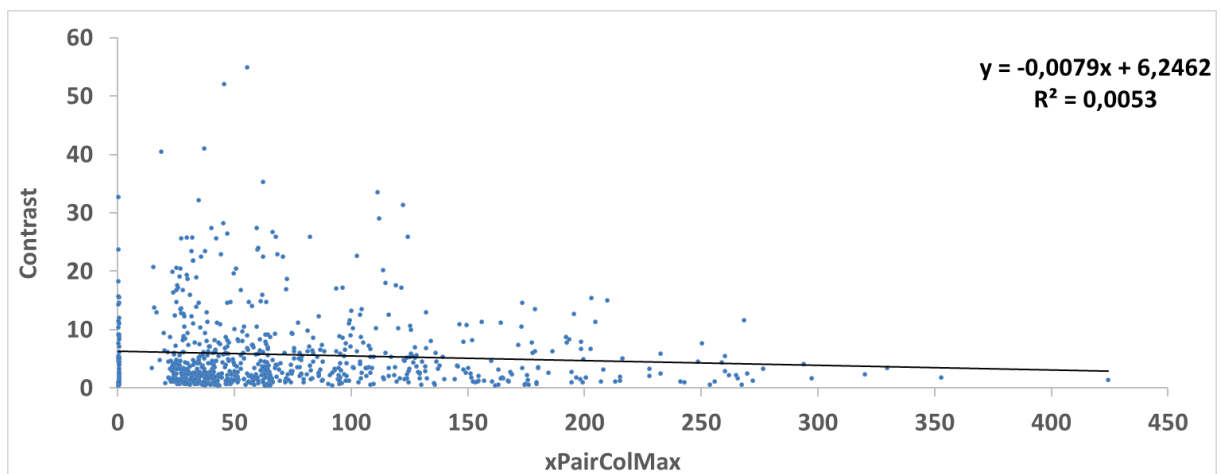
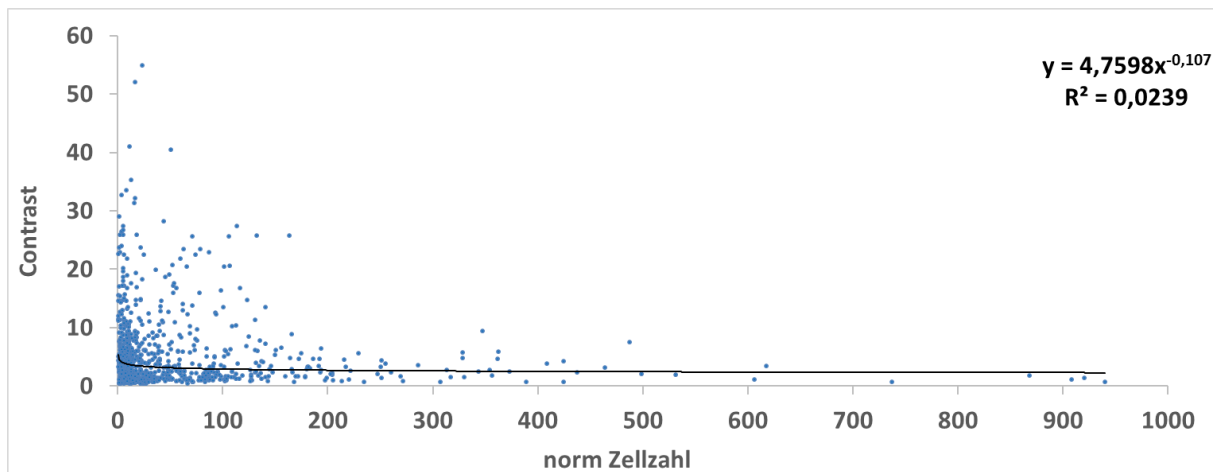


Abb. 129: Punktwolken-Diagramm von Contrast mit norm.Zellzahl (oben), Contrast und xPairColMax (mittig) sowie Correlation mit norm.Zellzahl (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

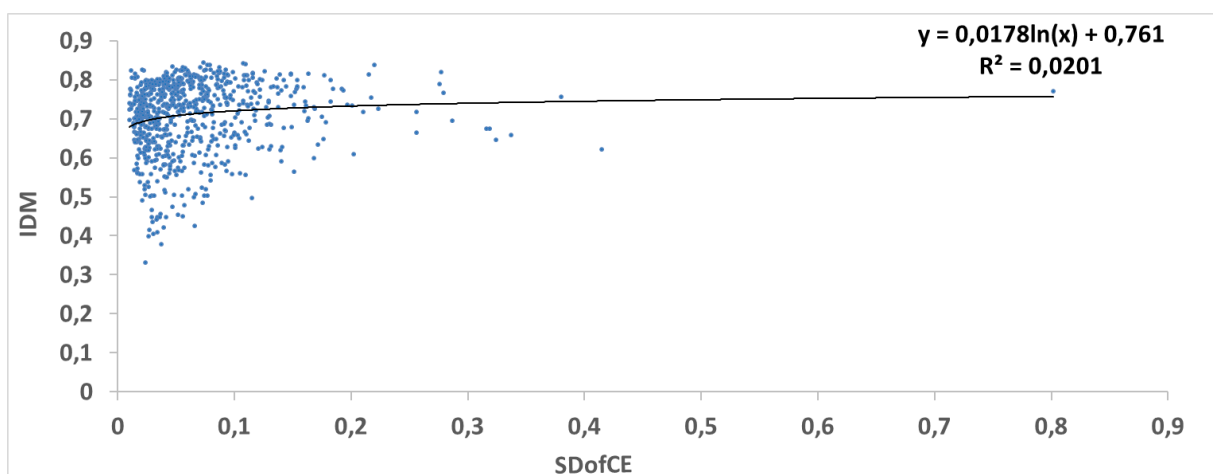
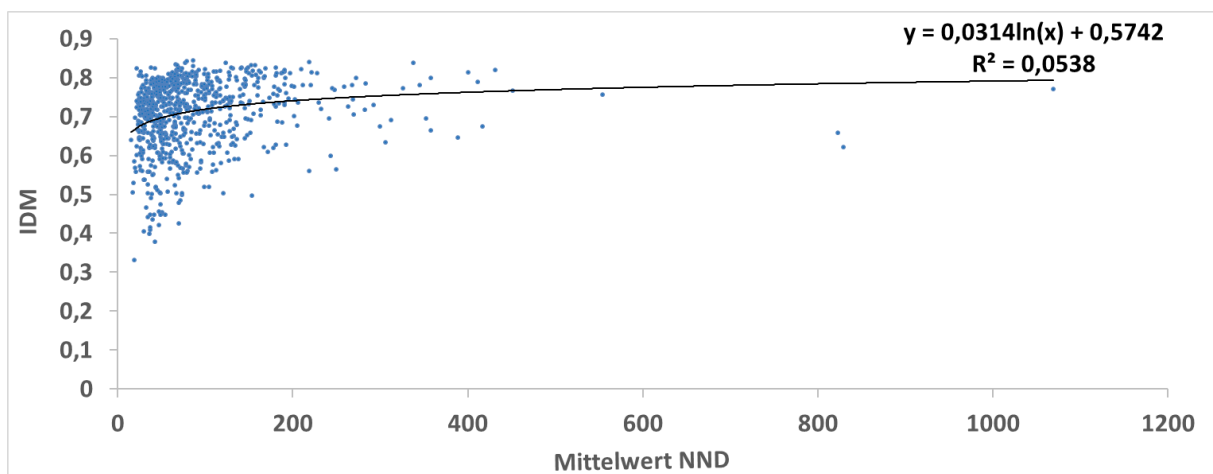
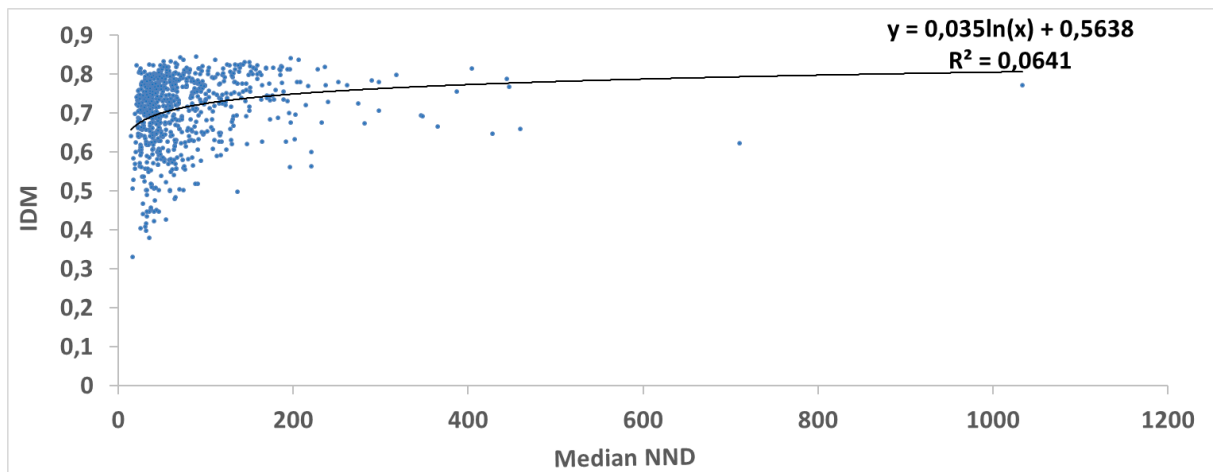


Abb. 130: Punktwolken-Diagramm von IDM und MedianNND (oben), IDM mit MittelwertNND (mittig) sowie IDM und SDofCE (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

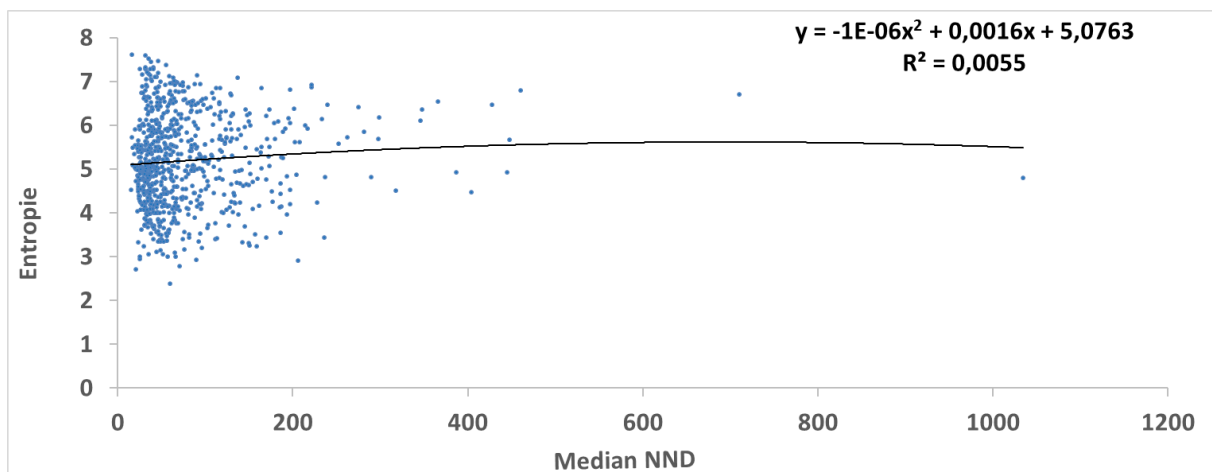
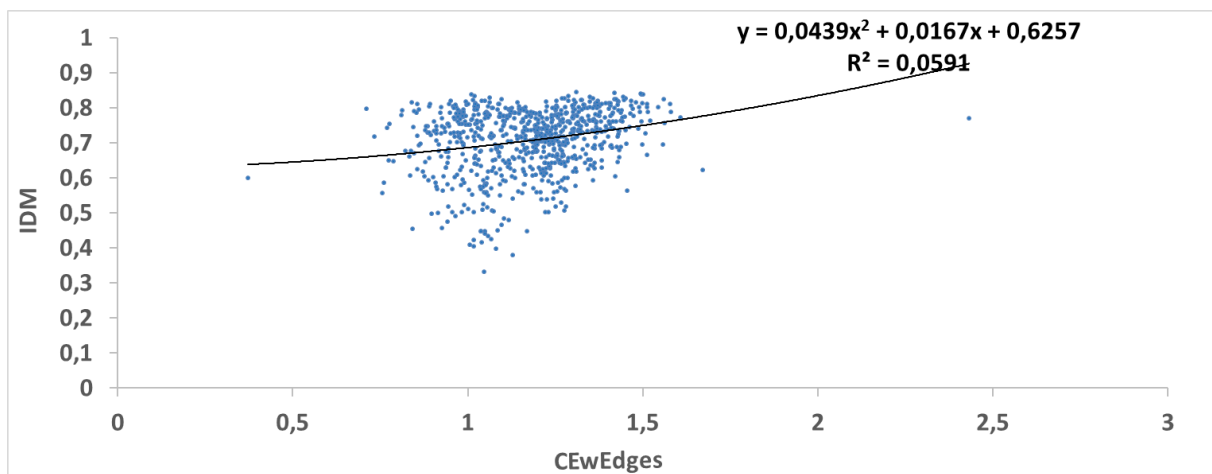
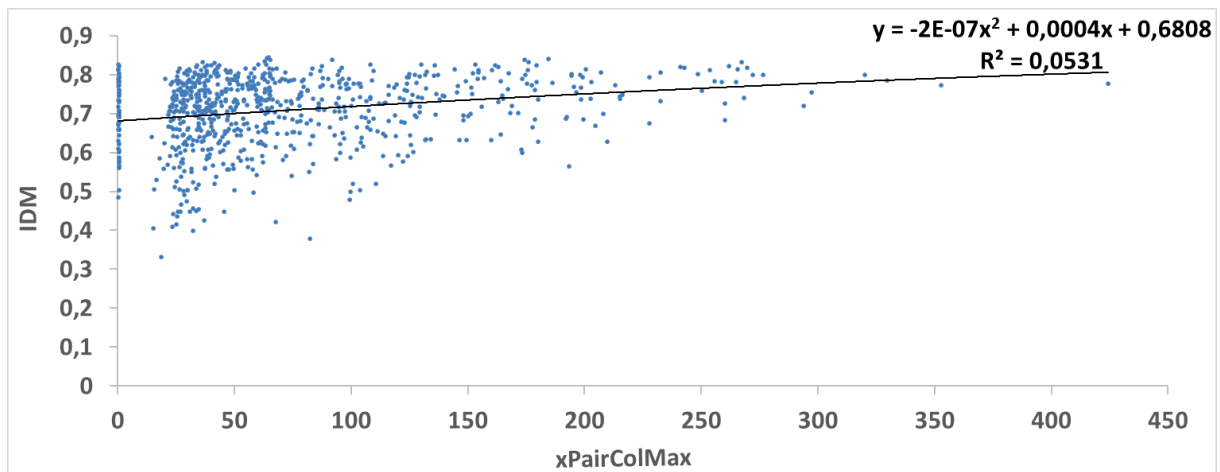


Abb. 131: Punktwolken-Diagramm von IDM mit xPairColMax (oben), IDM und CEwEdges (mittig) sowie Entropie mit MedianNND (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

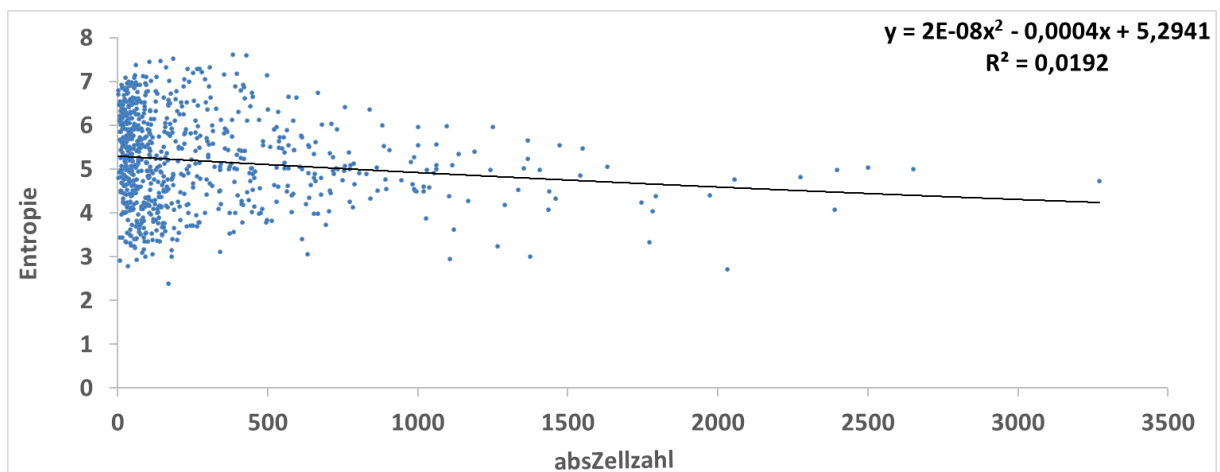
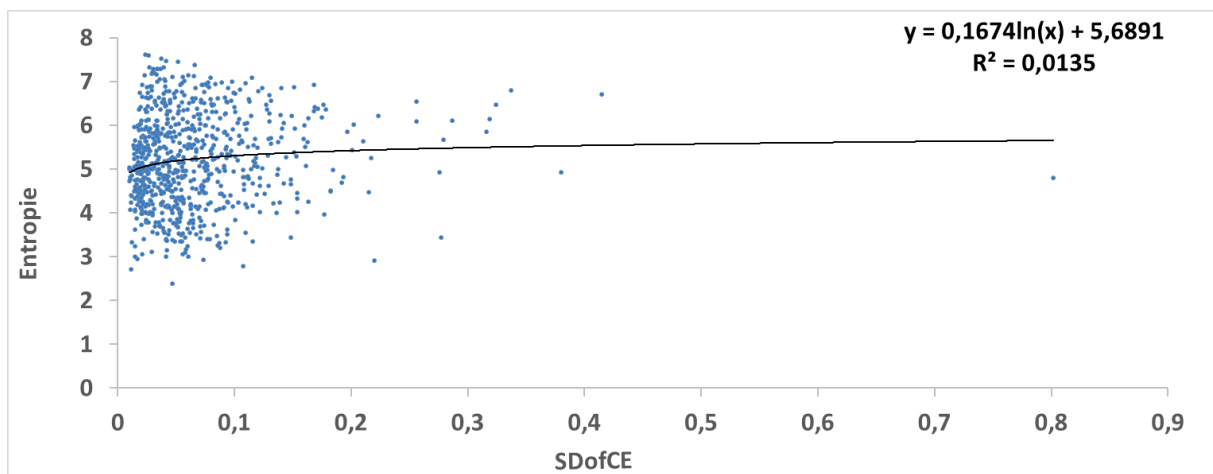
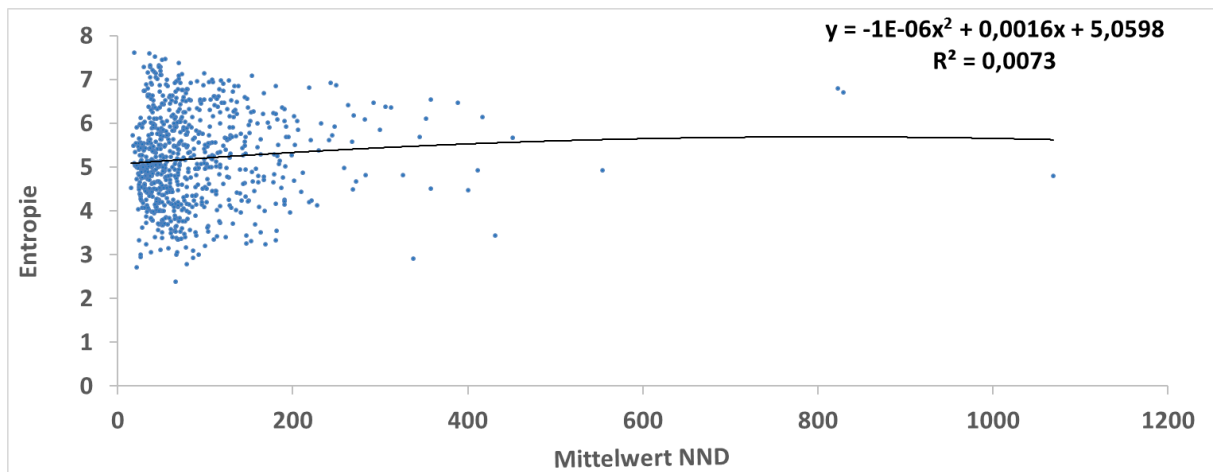


Abb. 132: Punktwolken-Diagramm von Entropie und MittelwertNND (oben), Entropie mit SDofCE (mittig) sowie Entropie und abs.Zellzahl (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

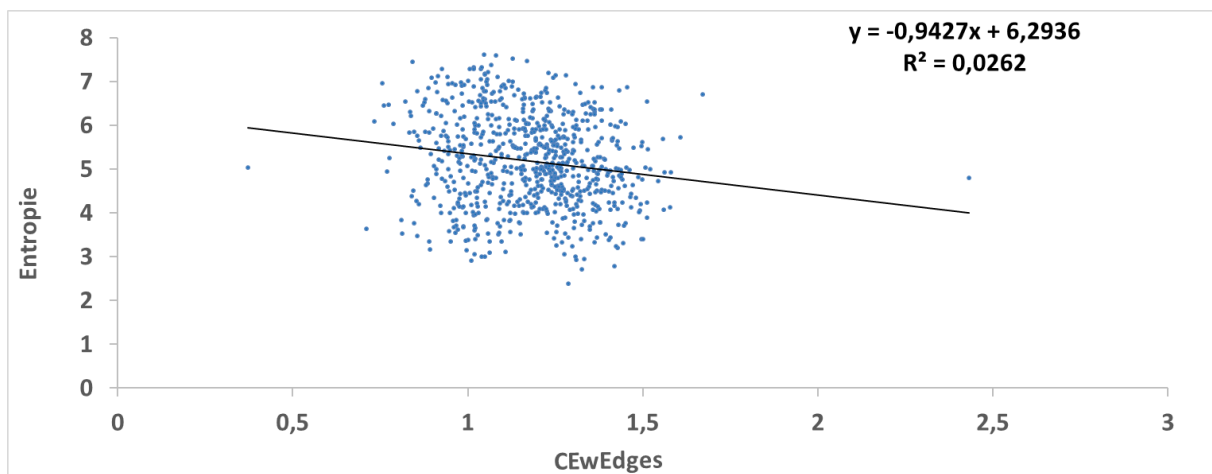
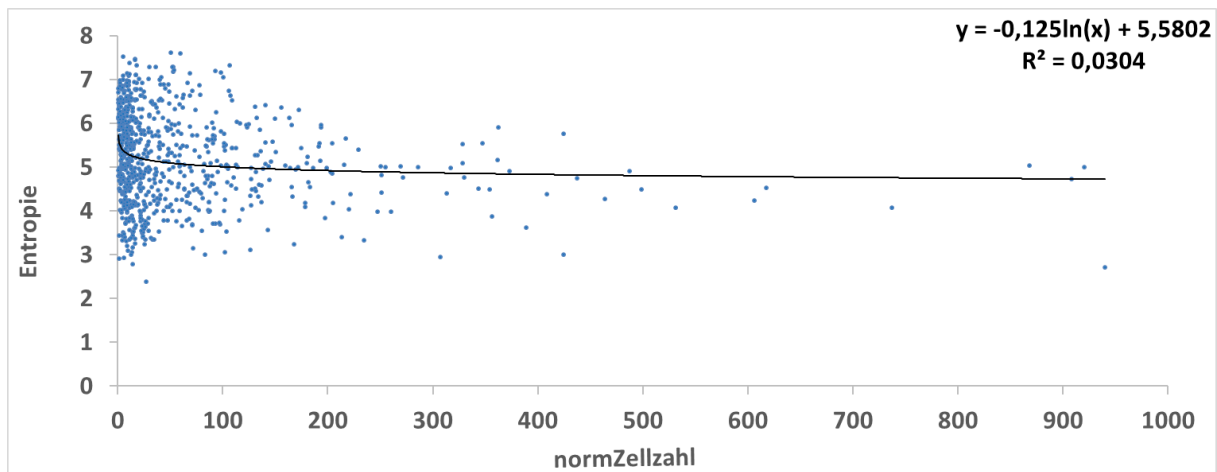


Abb. 133: Punktwolken-Diagramm von Entropie mit norm.Zellzahl (oben) sowie Entropie und CEwEdges (unten) als visuelle Darstellung signifikanter Korrelationen im Rahmen der lokal-Kachel-basierten Analyse. Diese Abbildung zeigt jeweils eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$), welche anhand des Kachel-basierten Pearson-Product-Moment-Correlation-Tests zwischen den jeweils angegebenen Parametern statistisch bestätigt wurde. Zusätzlich wird die Trendlinie incl. mathematischer Funktion und Bestimmtheitsmaß (R^2) abgebildet.

Von diesen 21 dargestellten **lokalen**, Kachel-basierten Korrelationen (von 60 möglichen) zeigte sich keine einzige Korrelation in der **globalen**, Proben-basierten Analyse.

Die hier dargestellten Daten zeigten, dass nur in der lokalen Analyse die räumliche Organisation mit dem texturanalytisch erfassten Schaden korrelierte.

Hierbei korrelierten 7 quantitativen Parameter der räumlichen Organisation mit texturanalytischen Parametern. Korrelationen mit drei texturanalytischen Parametern lagen bei MWNND, Abs. Zellzahl und CEwEdges, Korrelationen mit vier texturanalytischen Parametern lagen bei SDofCE und norm.Zellzahl vor.

3.11 Auswahl eines Panels an quantitativen und qualitativen Parametern zur Analyse der räumlichen Organisation

Mit dem Ziel die fluoreszenzmikroskopische Analyse der räumlichen Organisation als diagnostisches Kriterium zu verwenden, wird im Folgenden eine Auswahl an potentiellen Diagnoseparametern getroffen. Diese Auswahl beruht zum einen darauf, wieviele Knorpelproben mit einem Parameter statistisch unterschieden werden konnten, zum anderen darauf, ob und wieviele Korrelationen mit einem texturanalytisch festgestellten strukturellen Schaden der Knorpeloberfläche bestehen. Die in Kapitel 3.6 dargestellten Daten wurden hier für dieses Ziel wiederverwendet und erweitert.

Zunächst wurde mit den fluoreszenzmikroskopisch quantitativen Parametern der räumlichen Organisation untersucht, ob statistische Unterschiede zwischen Knorpelproben mit REM-visuellem Grad 1 vs. 2, Grad 1 vs. 3 und Grad 2 vs. 3 in diesen Parametern bestanden. Die Ergebnisse wurden oben in der Tabelle 12 dargestellt, welche nun modifiziert und erweitert wird.

Quantitativer Messparameter der räumlichen Organisation	Anzahl an Knorpelproben, die statistisch unterschieden werden konnten		Signifikante Korrelationen mit texturanalytisch erfasstem Knorpelschaden		Signifikante Korrelationen mit visuell-strukturellem Schädigungsgrad "Pattern"
	REM visueller Grad 1 vs. 2		Parameter	Anzahl	
	Anzahl von 28	in %			
MedianNND	7	25	ASM, IDM	2	x
MedianDegree	6	21,4	-	0	
MWNND	10	35,7	ASM, IDM, Entropie	3	x
MWDegree	7	25	-	0	
SDofCE	10	35,7	ASM, Contrast, IDM, Entropie	4	x
Abs.Zellzahl	10	35,7	ASM, Contrast, Entropie	3	x
Norm.Zellzahl	8	28,5	ASM, Contrast, Correl., Entropie	4	x
xPairColMax	4	14,2	Contrast, IDM	2	
PairColMax	10	35,7	-	0	x
CEwEdges	15	53,5	ASM, IDM, Entropie	3	x
MWDegreeNN	10	35,7	-	0	
MedianDegreeNN	0	0	-	0	
Fluoreszenz-mikroskopisch-visuelle Klassifizierung der räumlichen Organisation ("Pattern")	19	67,8	ASM, Contrast, Correlation, IDM, Entropie	5	

Tab. 21: Auswahl eines Panels an quantitativen und qualitativen Parametern zur Analyse der räumlichen Organisation für die Anwendung im Testsystem für früh-osteoarthritische Veränderungen. Modifikation und Erweiterung der Ergebnisse aus Tabelle 12 um signifikante Korrelationen mit texturanalytisch erfasstem Knorpelschaden und um signifikante Korrelationen mit dem Pattern (visuelle räumliche Schädigung / qualitative Veränderungen der räumlichen Organisation).

3.12 Testsystem für früh-osteoarthritische Veränderungen

Zunächst wurden diejenigen Parameter in der Tabelle 21 grau hinterlegt, die im Vergleich von Proben mit dem REM-visuellen Grad 1 vs. Grad 2 in den meisten Knorpelproben signifikante Unterschiede aufwiesen. Zusätzlich wurden signifikante Korrelationen mit texturanalytisch erfasstem Knorpelschaden und signifikante Korrelationen mit visuell-strukturellem Schädigungsgrad "Pattern" erfasst. Hieraus ergab sich die Auswahl der folgenden Parameter:

- MWNND
- SDofCE
- Abs. Zellzahl
- CEwEdges
- Organisationsmuster „Pattern“

Diese Parameter wurden verwendet, um festzustellen, wie viele der Knorpelproben mit dem **globalen** REM-visuellen Grad 1 vs. Grad 2 anhand dieser Parameter statistisch unterschieden werden können. Eine Knorpelprobe konnte signifikant zwischen Grad 1 und Grad 2 unterschieden werden, wenn einer der 5 Parametern einen signifikanten Unterschied zeigte. Dementsprechend werden im Folgenden die Signifikanztabellen für jeden dieser Parameter abgebildet und summiert. Die resultierende Signifikanztabelle 22 zeigt folglich dass 26 der 28 Probenvergleiche signifikante Level erreichten (92,80%).

Quantitativ & Pattern		Grad 2			
		ESA1	LKA1	HSC1	UZB1
Grad 1	UZA1				
	ADB1				
	HSA1				
	MRA1				
	ADC1				
	HSB1				
	EHA1				

Tab. 22: Summenbild der Signifikanztabellen von MWNND, SDofCE, Abs.Zellzahl, CEwEdges („Quantitativ“) und Pattern in Abhängigkeit der globalen REM-Klassifikation Grad 1 vs. Grad 2. Die Signifikanztabelle zeigt summiert für die genannten Parameter grün-kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von paarweisen POST HOC-Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede ergab.

3.13 Veränderungen der Organisation der superfiziellen Chondrozyten trotz REM-intakter Knorpelproben-Oberflächen

Die **globale** Rasterelektronenmikroskopisch-visuelle Klassifikation von Knorpelschäden wurde als Standard für die Beurteilung von strukturellen Schädigungen der Knorpeloberfläche gewählt. In Tabelle 23 werden alle Knorpelproben mit ihrer farbkodierten **globalen** REM-Einteilung dargestellt, wobei die Farbe Grün eine intakte Knorpeloberfläche (Grad 1), die Farbe Gelb eine leichte bis mittelgradige Schädigung der Knorpeloberfläche (Grad 2) und die Farbe Rot eine fortgeschrittene / schwere Schädigung der Knorpeloberfläche (Grad 3) markiert. Hierbei fiel auf, dass in Proben mit einer globalen REM-Einteilung Grad 1 (grün) die **lokale**, kachel-basierte visuelle REM-Einteilung nicht nur grün, sondern auch gelb bis rot kodiert wurden. In keiner der Proben mit einer globalen REM-Einteilung Grad 1 (grün) lag ein komplett gesundes räumliches Organisationsmuster („Strings“, Wert = 1) vor, was die Farbkodierung illustriert. Beispielhaft zeigt Probe MRA1 (Abb. 35) diesen Sachverhalt.

Probe:	REM-visuell global	REM-visuell lokal	Entropy	Pattern
UZA1	1	1,90	4,81	2,38
ADB1	1	1,58	5,50	2,88
HSA1	1	1,15	4,41	2,13
MRA1	1	1,33	4,67	3,14
ADC1	1	1,62	4,75	2,10
HSB1	1	1,11	4,46	2,13
EHA1	1	1,61	4,87	2,16
ESA1	2	2,10	5,79	3,31
LKA1	2	1,76	5,53	3,10
HSC1	2	2,16	4,53	3,11
UZB1	2	1,84	4,50	3,96
LKB1	3	2,51	6,06	4,02
MRB1	3	2,36	5,63	4,36
EHB1	3	2,67	5,04	4,19
UZC1	3	2,98	6,80	4,23
MRC1	3	2,63	4,78	3,60
EHC1	3	2,91	5,60	3,29
LKC1	3	2,94	5,89	3,11

Tab. 23: Gegenüberstellung farbkodierter Einteilungen des strukturellen Schadens und der visuellen Klassifikation der Organisationsanalyse und der Entropie mit der globalen REM-visuellen Einteilung als Referenz.

Wichtigerweise lagen somit in rasterelektronenmikroskopisch **global** intakten Proben bereits Veränderungen der räumlichen Chondrozyten-Organisation vor. Somit zeigte diese Arbeit, dass pathologische Veränderungen der Organisation der superfiziellen Chondrozyten bereits in rasterelektronenmikroskopisch global intakten Proben vorkamen.

Probe:	REM-visuell global	REM-visuell lokal	Entropy	Pattern	MWNND	SDofCE	Absolute Zellzahl	CEwithEdges
UZA1	1	1,90	4,81	2,38	46,95	0,04	566,03	1,27
ADB1	1	1,58	5,50	2,88	36,61	0,03	565,61	1,21
HSA1	1	1,15	4,41	2,13	88,35	0,05	468,70	1,35
MRA1	1	1,33	4,67	3,14	127,48	0,09	66,28	1,01
ADC1	1	1,62	4,75	2,10	70,41	0,05	721,38	1,44
HSB1	1	1,11	4,46	2,13	60,28	0,05	544,89	1,32
EHA1	1	1,61	4,87	2,16	100,01	0,06	291,35	1,22
ESA1	2	2,10	5,79	3,31	80,49	0,05	268,95	1,21
LKA1	2	1,76	5,53	3,10	69,74	0,06	298,20	1,22
HSC1	2	2,16	4,53	3,11	123,56	0,09	97,55	1,09
UZB1	2	1,84	4,50	3,96	70,35	0,05	251,16	1,11
LKB1	3	2,51	6,06	4,02	87,74	0,05	226,20	1,26
MRB1	3	2,36	5,63	4,36	111,57	0,08	140,61	1,10
EHB1	3	2,67	5,04	4,19	111,47	0,08	120,47	1,10
UZC1	3	2,98	6,80	4,23	54,14	0,05	187,19	1,03
MRC1	3	2,63	4,78	3,60	110,09	0,09	79,75	1,02
EHC1	3	2,91	5,60	3,29	102,07	0,07	127,18	1,04
LKC1	3	2,94	5,89	3,11	184,33	0,14	48,36	1,03

Tab 24: *Erweiterte Gegenüberstellung farbkodierter Einteilungen des strukturellen Schadens, der quantitativen und qualitativen Parameter (visuelle Klassifikation) der Organisationsanalyse und der Entropie mit der globalen REM-visuellen Einteilung als Referenz.*

Tabelle 24 verdeutlicht unterschiedliche Farbkodierungen der einzelnen Parameter der Organisationsanalyse. Die Erweiterung um die fluoreszenzmikroskopischen, quantitativen Parameter MWNND, SDofCE, Abs.Zellzahl und CEwEdges entspricht dabei der vorangegangenen Zusammenführung dieser quantitativen Parameter mit dem „Pattern“ in der (Signifikanz-) Tabelle 22. Besonders auffällig war, dass die visuelle Klassifikation der Organisation der superfiziellen Chondrozyten bereits dunklere Farben und somit eine vorangeschrittene Pathologie im Vergleich zu den quantitativen Parametern zeigt, die deutlich „grüner“ farbkodiert wurden und relativ gesehen weniger pathologische Veränderungen zeigten als die visuelle Klassifikation.

In der **lokalen**, Kachel-basierten Analyse wurden 197 von den 781 Kacheln als lokaler, REM Grad 1 klassifiziert. Von diesen 197 REM-Grad 1 Kacheln beinhalteten 185 Kacheln eine räumliche Organisation, die nicht mehr einer gesunden Knorpeloberfläche (Pattern-Wert = 1) entsprachen, sondern bereits pathologische Veränderungen (Pattern-Wert im Durchschnitt 2,58) beinhalteten. Dies entsprach

einem Prozentsatz von 93,9% von Kacheln, mit REM-intakter Oberfläche, aber pathologischer Organisation.

Von 781 Kacheln in der **lokalen** Betrachtung zeigten nur 28 Kacheln ein normales Organisationsmuster (Pattern=1; 3,6%). Von diesen 28 Kacheln zeigten 12 auch in der lokalen, REM-visuellen Untersuchung eine intakte Oberfläche (REM lokal Grad1; 42,9%), während 16 Kacheln in der lokalen, REM-visuellen Untersuchung bereits als geschädigt klassifiziert wurden (REM lokal >Grad1; 57,1%). Auf die Gesamtheit aller Kacheln (n=781) bezogen, zeigten 1,54% aller Kacheln in der lokalen, REM-visuellen Untersuchung eine intakte Oberfläche (REM lokal Grad1) und ein normales Organisationsmuster, während 2,05% aller Kacheln in der lokalen, REM-visuellen Untersuchung als geschädigt klassifiziert wurden (REM lokal >Grad1) und dabei ein normales Organisationsmuster aufwiesen.

Zur Verdeutlichung dieser Daten zeigt die folgende Tabelle 25 die qualitativen und quantitativen Daten der Organisationsanalyse zu allen Kacheln, die als REM-lokal Grad 1 (intakte Oberfläche) eingeteilt wurden.

4. Diskussion

Die Diagnose früher struktureller Veränderungen im Gelenkknorpel ist nach wie vor ein klinisches Problem. In diesem Kontext ist die Organisation der Chondrozyten als bildbasierter Biomarker zur Feststellung früher struktureller und/oder degenerativer Veränderungen prinzipiell geeignet. Dieser Biomarker beruht bisher im Wesentlichen auf einer subjektiven Klassifizierung der Verteilungsmuster der oberflächennahen Chondrozyten (sog. „Score“), da bisher nur wenige quantitative Daten (Clark-Evans-Index) verwendet wurden [81-83]. Um die Verwendung der räumlichen Organisation der superfiziellen Chondrozyten als bildbasierter Biomarker methodisch weiterzuentwickeln, hatte die vorliegende Arbeit das Ziel, relevante Fragen zu beantworten.

Die erste Frage war, wie gut sich die Klassifizierung und/oder Quantifizierung der Organisation der Chondrozyten zur Detektion von (frühen) strukturellen Veränderungen eignet, gemessen anhand der Rasterelektronenmikroskopie und nachfolgend der Texturanalyse der gewonnenen Bilder. Hierzu wurden 18 humane Knorpelproben rasterelektronenmikroskopisch und anschließend fluoreszenzmikroskopisch sowohl global als auch kachel-basiert lokal ausgewertet.

Die oben dargestellten Daten zeigen in der globalen Betrachtung einer Probe insgesamt, dass Proben mit einer makroskopisch-visuellen Einteilung von 1 eine REM-visuelle Einteilung von 1 bis 2 und räumliche Organisationsmuster von 2,2 bis 3,3 aufwiesen. Bei der Betrachtung der Daten zeigte sich, dass keine einzige Probe und keine einzige Kachel eine String-Organisation aufwiesen, und dass Proben mit Double-String- und Cluster-Organisationen makroskopisch-visuell im Grad 1 eingeteilt wurden. Dies war dadurch zu erklären, dass es sich um OA-Knorpelproben handelte. Dass Proben mit Double-String- und Cluster-Organisationen makroskopisch-visuell im Grad 1 eingeteilt wurden, zeigte, dass Veränderung der Organisation auch im visuell-makroskopisch intaktem Knorpel zu finden waren und möglicherweise vor einem makroskopisch-visuell sichtbaren Schaden auftreten könnten. Dies wird nachfolgend noch detaillierter diskutiert werden.

Die zweite Frage der vorliegenden Arbeit war, zu beantworten, wie global ähnlich oder lokal variabel Veränderungen der Chondrozyten-Organisation im Vergleich zu rasterelektronenmikroskopisch gewonnenen Daten waren, und ob lokale Betrachtungen der Chondrozyten-Organisation ausreichend sind, um globale strukturelle Schäden zu erkennen.

Zunächst fiel auf, dass die makroskopisch-visuelle Einteilung, die REM-visuelle Einteilung und die räumlichen Organisationsmuster eine hohe Streubreite der Daten zeigten und Zusammenhänge bei der globalen Betrachtung der Proben nicht ohne weitere Analysen erkennbar waren. Aus diesem Grunde wurde zusätzlich zur globalen Analyse der Proben eine kachel-basierte Analyse durchgeführt, um lokale Korrelationen zwischen der makroskopisch-visuellen Einteilung, der REM-visuellen Einteilung und den räumlichen Organisationsmustern mathematisch aufdecken zu

können. Bei dieser lokalen, kachel-basierten Analyse zeigte sich bei Proben, die global in den REM-visuellen Schädigungsgrad 1 eingeteilt wurden, eine kachel-basierte REM-visuelle Schädigung in den Schweregraden 1 bis 3. Gleiches galt für die globale Schädigungsgrade 2 und 3. Bei beiden wurden jeweils kachel-basierte REM-visuelle Schädigungen im Grad 1 und 3 gefunden. Bei dieser lokalen, kachel-basierten Analyse zeigte sich bei Proben, die global in den REM-visuellen Schädigungsgrad 1 und 2 eingeteilt wurden, jeweils makroskopisch-visuelle Schädigungen im Grad 1 bis 3, im globalen REM-visuellen Schädigungsgrad 3 makroskopisch-visuelle Schädigungen im Grad 2 und 3. Bei dieser lokalen, kachel-basierten Analyse zeigten sich in allen globalen REM-visuellen Schädigungsgraden, jeweils Schädigungsausmaße in der räumlichen Verteilungen (Pattern) in den Graden 1 bis 3. Insgesamt zeigen diese Daten, dass die **globale** REM-visuelle Probenanalyse nicht die Spannweite von Schädigungen aufdeckte, wie sie *lokal* makroskopisch-visuell, **lokal** REM-visuell und *lokal* fluoreszenzmikroskopisch bei der Muster-Analyse vorlagen. Schlussfolgernd scheint eine Kachel-basierte, **lokale** Betrachtung der Korrelationsanalyse unter Umständen genauere Informationen zu enthalten und für weiteren Analysen gegebenenfalls geeigneter zu sein, was zum Teil an der deutlich größeren verarbeiteten Datenmenge bei Kachel-basierter Analyse liegen könnte.

Die dritte Frage dieser Arbeit war es, welcher qualitative oder quantitative Parameter der Chondrozyten-Organisation sich möglicherweise eignet, um frühe strukturelle Veränderungen zu erkennen und ob dieser Parameter mit Textur-Analyse-Parametern der rasterelektronenmikroskopisch gewonnenen Bilder korreliert.

Hierzu wurden zunächst alle Proben nach ihrer **globalen** REM-visuellen Einteilung klassifiziert, da die REM-Aufnahmen aufgrund ihrer Auflösung und ihrer Top-Down-Ansicht als Referenzmethode für alle anderen untersuchten Methoden gewählt wurden. Die erarbeiteten Ergebnisse zeigen, dass die Kategorisierung der Proben nach ihrer **globalen** REM-visuellen Einteilung zu signifikanten Unterschieden in allen Texturanalysewerten führte. Es folgte deshalb eine detailliertere Analyse, in der die **lokalen**, kachel-basierten Werte aller Proben berücksichtigt wurden. Bei dieser zeigte sich die gesamte in allen Proben gemessene ASM-Spannweite von 0,002 bis 0,143 bereits innerhalb der Kacheln einer einzigen Probe. Gleiches galt für Contrast und Correlation, was zeigte, dass die globale REM-visuelle Einteilung weniger detaillierte Informationen als die errechneten Texturanalysewerte der einzelnen Kacheln beinhaltete. Bei IDM und Entropie wurden 76% und 85% der gesamten Datenspannweite innerhalb einer Probe gemessen. Somit erschien die quantitative REM-Analyse anhand einer Texturanalyse besser geeignet, um strukturelle Schäden der Knorpeloberfläche anhand von REM-Aufnahmen zu erfassen. Insgesamt zeigen diese Daten auch, dass in der **lokalen**, kachel-basierten Korrelationsanalyse die besten Bestimmtheitsmaße auftraten, wenn Korrelationen mit Entropie vorlagen (ASM und Entropie: 0,96; Contrast und Entropie: 0,638; Correlation und Entropie: 0,89; IDM und Entropie: 0,78). Somit ist es denkbar, Entropie stellvertretend als alleinigen Texturanalyse-Parameter zu wählen.

Nach der Texturanalyse wurden nun alle Proben nach ihrer globalen REM-visuellen Einteilung hinsichtlich verschiedener fluoreszenzmikroskopisch-quantitativen Parameter der räumlichen Organisation untersucht. Hier zeigte sich, dass die Kategorisierung der Proben nach ihrer globalen REM-visuellen Einteilung zu signifikanten Unterschieden bei 10 von 12 erhobenen Messparametern der quantitativen Analyse der räumlichen Organisation führten. Nur die fluoreszenzmikroskopisch erhobenen xPairColMax- und die MWDegreeNN-Messwerte zeigten keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit ihrer globalen REM-visuellen Einteilung, während die anderen 10 Messparameter signifikante Unterschiede in Abhängigkeit ihrer globalen REM-visuellen Einteilung zeigten. Die global gefundenen statischen Unterschiede in der globalen REM-visuellen Einteilung zwischen Grad 1 vs. 2, Grad 1 vs. 3 und Grad 2 vs. 3 wurden bei den Parametern MWNND, SDofCE, Abs.ZZ, NormZZ, PairColMax und CEwEdges gefunden. Die global gefundenen statischen Unterschiede in der globalen REM-visuellen Einteilung zwischen Grad 1 vs. 2 und Grad 1 vs. 3 wurden bei den Parametern MedNND, MedDegree und MWDegree gefunden. Die global gefundenen statischen Unterschiede in der globalen REM-visuellen Einteilung zwischen Grad 1 vs. 3 wurden nur bei MedianDegreeNN gefunden. Dies deutet darauf hin, dass 10 von 12 quantitativen Parametern der räumlichen Organisationsanalyse möglicherweise dazu geeignet sind osteoarthritis induzierte Veränderungen der Knorpeloberfläche bereits in einer globalen Analyse quantitativ zu erfassen.

Es folgte eine detailliertere Analyse, in der nun auch die lokalen, kachel-basierten Werte aller Proben berücksichtigt wurden. Bei dieser zeigte sich nur bei PairColMax die gesamte Spannbreite aller über alle Proben hinweg erhobenen Messwerte (100%) in einer einzelnen Probe (LKC1, min: 0, max: 239,05). Die kleinste gesamte Datenspannbreite über alle Proben hinweg fand sich beim Parameter MWDegree (77,9%), gefolgt von MWDegreeNN (79,5%) und CEwithEdges (83,9%). Alle anderen Parameter zeigten Abbildungen der gesamten Datenspannweite innerhalb von einer Probe von mindestens 94,6%. Diese Werte zeigen, dass in der lokalen Betrachtung der Knorpeloberfläche durch die quantitative Analyse der räumlichen Organisation eine hohe lokale Varianz in allen erhobenen Messparametern vorliegt. Hervorzuheben ist, dass trotz dieser lokalen Varianz in der globalen Analyse statistische Unterschiede gefunden wurden.

Mit dem Ziel die fluoreszenzmikroskopische Analyse der räumlichen Organisation als diagnostisches Kriterium zu verwenden, wurde im Anschluss untersucht, ob statistische Unterschiede in Parametern der räumlichen Organisation zwischen Knorpelproben mit REM-visuellem Grad 1 vs. 2, Grad 1 vs. 3 und Grad 2 vs. 3 bestanden. Detailliert wurden sieben Grad 1 Knorpelproben gegen vier Grad 2 Knorpelproben getestet. Dies ergab 28 mögliche signifikante Unterschiede. Nun wurde für jeden Parametern der räumlichen Organisation ausgezählt, wie viele dieser 28 möglichen Unterschiede eine statistische Signifikanz erreichten. Analog wurden Grad 1 vs. 3 (Grad 1: sieben Proben; Grad 3: sieben Proben; 49 mögliche Unterschiede) und Grad 2 vs. 3 (Grad 2: vier Proben; Grad 3: sieben Proben; 28 mögliche

Unterschiede) untersucht. Diese Tests ergaben, dass mehrere Parameter der räumlichen Organisation signifikant unterschiedlich zwischen Knorpelproben mit einer REM visuellen Schädigung Grad 1 vs. Grad 2 waren. WNNND, SDofCE, abs. Zellzahl, CE withEdges, und MWDegreeNN zeigen (im Vergleich zu den übrigen Parametern) in den meisten statistischen Vergleichen von Knorpelproben signifikante Unterschiede. In diesem Kontext wurde auch der fluoreszenzmikroskopische visuelle Score „Pattern“ mit derselben Methode untersucht. Hier zeigte sich, dass dieser in allen Testreihen (Grad 1 vs. 2, Grad 1 vs. 3 und Grad 2 vs. 3) in einer deutlich höheren Anzahl von statistischen Vergleichen von Knorpelproben signifikante Unterschiede aufwies. Dies bedeutet möglicherweise, dass nicht nur die quantitativen Parameter der räumlichen Organisation, sondern auch die visuelle Klassifizierung der Organisationsmuster für die Beurteilung von strukturellen Knorpelschäden verwendet werden kann.

In der **lokalen**, Kachel-basierten Betrachtung zeigten vier der insgesamt zwölf innerhalb der Gruppe quantitativen fluoreszenzmikroskopisch erhobenen Messparameter mit jeweils sieben anderen Parametern eine Korrelation (63,6%). Dies waren SDofCE, Absolute Zellzahl, xPairColMax und CEwithEdges. In der **globalen**, Proben-basierten Betrachtung zeigten fünf Parameter jeweils sechs Korrelationen (54,5%) innerhalb der Gruppe quantitativen fluoreszenzmikroskopisch erhobenen Messparameter. Dies waren MWNND, SDofCE, Absolute Zellzahl, PairColMax und CEwithEdges. Insgesamt zeigen diese Daten, dass sowohl in der globalen als auch der lokalen Analyse ein Panel miteinander korrelierender Parameter zur Analyse der räumlichen Organisation vorliegt, aber das auch nicht-miteinander korrelierende Parameter vorliegen. Dieses Panel, aber möglicherweise auch die übrigen nicht-miteinander korrelierenden Parameter können möglicherweise als Diagnosekriterium für früh-osteoarthritische Veränderungen verwendet werden.

Insgesamt zeigt dies, dass die Einteilungen, mit denen Schädigungen der untersuchten Knorpelproben an der Oberfläche erfasst wurden, miteinander korrelierten und somit die strukturellen Schäden auf **lokaler**, kachelbasierter Ebene systematisch durch miteinander in Beziehung stehende Einteilungen abgebildet wurden. Dies spricht für die Verlässlichkeit des verwendeten Einteilungssystems.

Die erarbeiteten Daten zeigten zudem, dass alle quantitativen Parameter zur Analyse der räumlichen Organisation mit mindestens einem Score zur Erfassung des strukturellen Schadens der Knorpelproben korrelierten. 8 von 12 quantitativen Parametern korrelierten mit 3 oder 4 Scores, mit denen der strukturelle Schaden erfasst wurde. Insofern erscheint demnach die überwiegende Mehrzahl der quantitativen Parameter möglicherweise als diagnostisches Kriterium geeignet. Insgesamt zeigt dies, dass die quantitativen Parameter, die für die Analyse der räumlichen Organisation verwendet wurden, mit den verwendeten Scores zur Erfassung des strukturellen Schadens korrelierten und somit auf **lokaler**, kachelbasierter Ebene und somit mit dem strukturellen Schaden in Beziehung stehen. Dies spricht für das Potenzial dieser Methodik zur Diagnose osteoarthritischer Veränderungen.

Im Folgenden wurde die Texturanalyse der REM-Bilder verwendet, um das Schadensausmaß nicht durch eine subjektive Einteilung, sondern durch eine quantitative Analyse zu erfassen. Hier war das Ziel zu beantworten, ob in einer globalen vs. lokalen Analyse die räumliche Organisation mit dem texturanalytisch erfassten Schaden korreliert, und wenn ja, welche Parameter diese Korrelation aufwiesen.

Nur in der lokalen Analyse korrelierte die quantitativ erfasste räumliche Organisation mit den texturanalytisch erfassten Schäden, so dass quantitative Parameter der räumlichen Organisation besser in der lokalen Analyse als Diagnostikum zur Erfassung von strukturellen Schäden geeignet zu sein scheinen. In der lokalen Analyse korrelierten 7 quantitative Parameter der räumlichen Organisation mit texturanalytischen Parametern. Korrelationen mit drei texturanalytischen Parametern lagen bei MWNND, Abs.Zellzahl und CEwEdges, Korrelationen mit vier texturanalytischen Parametern lagen bei SDofCE und norm.Zellzahl vor. Dementsprechend erschienen diese Parameter möglicherweise als diagnostisch besonders geeignet.

Mit dem Ziel die fluoreszenzmikroskopische Analyse der räumlichen Organisation als diagnostisches Kriterium zu verwenden, wurde im Folgenden eine Auswahl an potentiellen Diagnoseparametern getroffen. Diese Auswahl beruhte zum einen darauf, wieviele Knorpelproben mit einem Parameter statistisch unterschieden werden konnten, zum anderen darauf, ob und wieviele Korrelationen mit einem texturanalytisch festgestellten strukturellen Schaden der Knorpeloberfläche bestehen.

Zunächst wurde mit den fluoreszenzmikroskopisch quantitativen Parametern der räumlichen Organisation untersucht, ob statistische Unterschiede zwischen Knorpelproben mit REM-visuellem Grad 1 vs. 2, Grad 1 vs. 3 und Grad 2 vs. 3 in diesen Parametern bestanden. Die Ergebnisse – wieviele Knorpelproben mit einem Parameter statistisch unterschieden werden konnten – wurden zunächst in der Tabelle 12 dargestellt, welche anschließend erweitert wurde. Zunächst wurden diejenigen Parameter ausgewählt und in der Tabelle 21 grau hinterlegt, die im Vergleich von Proben mit dem REM-visuellen Grad 1 vs. Grad 2 in den meisten Knorpelproben signifikante Unterschiede aufwiesen. Die Konzentration erfolgte dabei explizit auf den Vergleich mit Proben mit dem REM-visuellen Grad 1 vs. Grad 2, da hier Grad 1 intakte Oberflächen und Grad 2 geringe Schäden an der Knorpeloberfläche representieren und als Testsystem für früh-osteoarthritische Veränderungen verwendet wurde. Zusätzlich wurden signifikante Korrelationen mit texturanalytisch erfasstem Knorpelschaden und signifikante Korrelationen mit visuell-strukturellem Schädigungsgrad "Pattern" erfasst.

Hieraus ergab sich die Auswahl der folgenden Parameter:

- MWNND
- SDofCE
- Abs. Zellzahl
- CEwithEdges
- Visuell klassifiziertes räumliches Organisationsmuster „Pattern“

Diese Parameter wurden im Folgenden verwendet, um festzustellen, wie viele der Knorpelproben mit dem REM-visuellen Grad 1 vs. Grad 2 anhand dieser Parameter statistisch unterschieden werden konnten. Hierzu wurde folgende Herangehensweise gewählt: eine Knorpelprobe konnte signifikant zwischen Grad 1 und Grad 2 unterschieden werden, wenn einer der oben genannten 5 Parameter einen signifikanten Unterschied zeigte. Im Folgenden wurden die Signifikanztabellen für jeden dieser Parameter abgebildet und summiert. Die resultierende (Signifikanz)-Tabelle 22 zeigte, dass 26 der 28 Probenvergleiche signifikante Level erreichten. Dies entsprach einer diagnostisch korrekten Klassifikation von 92,80%. Dies bedeutete, dass die ausgewählten fünf Parameter vielversprechende Kandidaten für die Früh-Diagnostik oberflächlicher osteoarthritischer Knorpelveränderungen durch qualitative und quantitative Analysen der räumlichen Organisation sind.

Die vierte (somit letzte) und vielleicht wichtigste Frage der vorliegenden Arbeit war, zu beantworten, wie früh Veränderungen der Chondrozyten-Organisation im Vergleich zu visuellen Klassifikationen oder im Vergleich zu strukturellen Oberflächenschäden der Knorpeloberfläche, erfasst in der Rasterelektronenmikroskopie, auftreten.

In Tabelle 24 wurden alle Knorpelproben mit ihrer farbkodierten **globalen** REM-Einteilung dargestellt, wobei die Farbe Grün eine intakte Knorpeloberfläche (Grad 1), die Farbe Gelb eine leichte bis mittelgradige Schädigung der Knorpeloberfläche (Grad 2) und die Farbe Rot eine fortgeschrittene / schwere Schädigung der Knorpeloberfläche (Grad 3) markiert. Hierbei fiel auf, dass in Proben mit einer globalen REM-Einteilung Grad 1 (grün) die **lokale**, kachel-basierte visuelle REM-Einteilung nicht nur grün, sondern auch gelb bis rot kodiert wurden. Dies bedeutete, dass die lokale, kachel-basierte Analyse Schäden aufdeckte, die in der globalen Analyse nicht sichtbar waren. Die quantitative Texturanalyse der REM-Bilder bestätigte diese Aussage, da auch Proben mit einer globalen REM-Einteilung Grad 1 Einteilung nicht nur grün, sondern auch gelb bis rot kodiert wurden. In keiner der Proben mit einer globalen REM-Einteilung Grad 1 (grün) lag ein gesundes räumliches Organisationsmuster (Strings) vor. Beispielhaft zeigte Probe MRA1 (Abb. 35) diesen Sachverhalt.

Hierin ist die vielleicht wichtigste Aussage dieser Arbeit zu finden, denn in rasterelektronenmikroskopisch **global** intakten Proben lagen bereits Veränderungen der räumlichen Chondrozyten-Organisation vor. Somit zeigt diese Arbeit, dass pathologische Veränderungen der Organisation der superfiziellen Chondrozyten bereits in rasterelektronenmikroskopisch global intakten Proben vorkamen,

möglicherweise einem strukturellen Schaden vorangehen und dementsprechend diagnostisch verwertbar sein können. Tabelle 25 verdeutlicht zudem unterschiedliche Farbkodierungen der 5 ausgewählten Parameter der Organisationsanalyse. Besonders auffällig war auch hier, dass die visuelle Klassifikation der Organisation der superfiziellen Chondrozyten bereits dunklere Farben und somit eine vorangeschrittene Pathologie im Vergleich zu den quantitativen Parametern zeigte, die deutlich „grüner“ farbkodiert wurden und relativ gesehen weniger pathologische Veränderungen zeigten als die visuelle Klassifikation. Damit könnte die visuelle Klassifikation ein besonders wichtiges Kriterium in der Früh-Diagnose von osteoarthritischen Veränderungen sein, vor allem, da Veränderungen in der visuellen Klassifikation einem REM-sichtbaren strukturellen Schaden vorangingen.

Bei den verwendeten Knorpelproben von Patienten mit einer manifesten Gonarthrose war der überwiegende Anteil der Gelenkoberfläche (74,78% aller Kacheln) lokal REM-visuell geschädigt, während das Organisationsmuster in 96,41% aller Kacheln pathologisch war. In den übrigen 3,59% der Kacheln mit einem gesunden Organisationsmuster zeigte die überwiegende Mehrheit (57,1%) einen in der REM erkennbaren strukturellen Schaden. Diese Zahlen verdeutlichen, dass in Knorpeloberflächen aus klinisch osteoarthritischen Gelenken 96,41% der Knorpeloberfläche eine pathologische Organisation aufweist und eine gesunde Organisation nur noch marginal zu finden ist. Insofern ist die alleinige Verwendung der räumlichen Organisation der superfiziellen Chondrozyten als Diagnostikum geeignet, v.a. da diese Veränderungen in der räumlichen Organisation bereits ohne sichtbare strukturelle Veränderungen nachweisbar scheinen.

Mankin publizierte 1971 eine auf histologischen Untersuchungen basierende mikroskopische Einteilung (Histological-Histochemical Grading System (HHGS) oder auch Mankin Score) für die Quantifizierung der Arthrose [6]. Dieser wird heute noch mit am häufigsten angewendet, obwohl er eine Reihe von Nachteilen aufweist (z.B. hohe Intra- und Interobserver-Variabilität [86-88]) und in verschiedenen Modifikationen angewendet wird [89-93]. Die Osteoarthritis Research Society International (OARSI) stellte 2006 den sog. OARSI-Score vor, der im Vergleich zum HHGS eine höhere Reliabilität aufweist [94] und additiv auch Schädigungen von Knorpelmatrix und Knorpeloberfläche berücksichtigt.

Nach Arnscheidt et al [5] sind aktuell zwei Verfahren zur (indirekten oder direkten) Detektion von Schäden am Gelenkknorpel im klinischen Einsatz. Beide Verfahren können Schäden jedoch erst im OARSI-Stadium II im Übergang zu Stadium III, bzw. erst im OARSI-Stadium III detektieren, eine Frühdiagnose von Knorpelschäden ist somit nicht verfügbar. Eine Reihe weiterer, in experimentellem Einsatz stehender Verfahren zur Frühdiagnose, scheinen geeignet, Schäden bereits im OARSI-Stadium II detektieren zu können. Die folgende Abbildung 134 gibt hierzu einen Überblick.

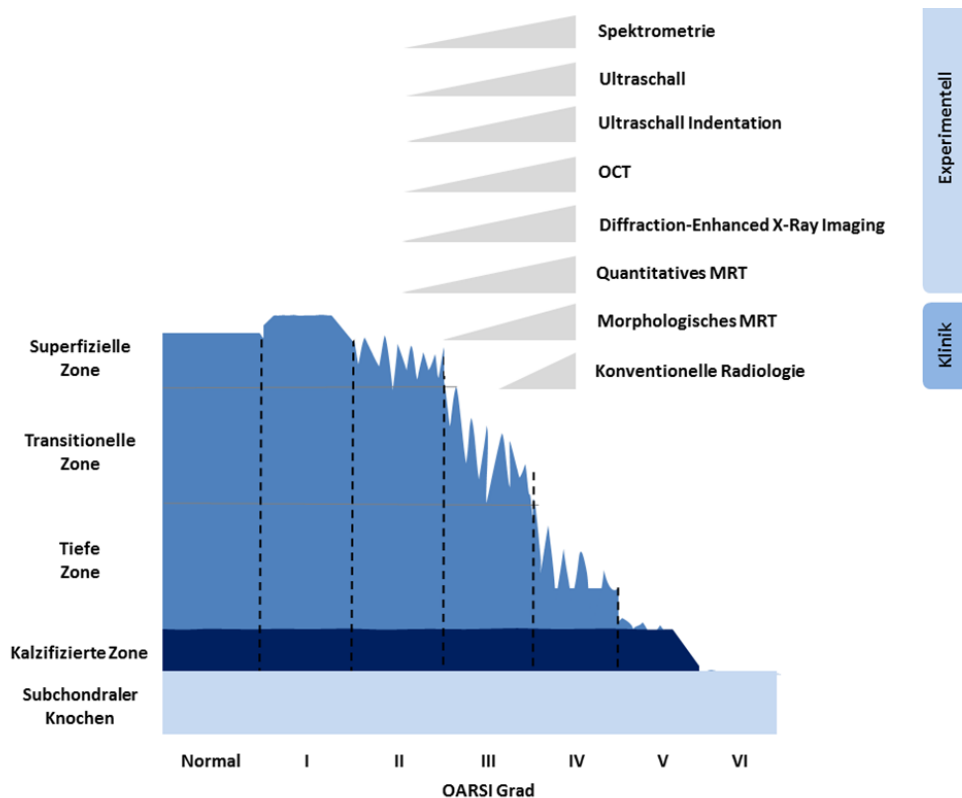


Abb. 134: „Gegenüberstellung der einzelnen Verfahren zur Diagnose der Früharthrose“. Modifiziert entnommen aus [5]. Abgebildet ist ein schematisches Knorpelgewebe (blau), welches von links nach rechts zunehmende OARSI-Stadien der Degeneration zeigt. Es werden 9 verschiedene Methoden zur Diagnose der Früharthrose aufgeführt, von denen 6 experimentell sind und 2 klinisch angewendet werden. Die grauen Pfeile illustrieren das früheste OARSI-Stadium, das die verschiedenen diagnostischen Methoden technisch detektieren können. Diese Gegenüberstellung zeigt, dass alle 7 experimentellen Methoden prinzipiell in der Lage sind, die Fibrillation der Oberfläche (OARSI Grad II) zu detektieren“. Die Abb. stellt eine Modifikation von [5 und 95] dar.

Die in experimentellem Einsatz stehenden Methoden wiesen dabei die im Folgenden dargestellten Ergebnisse auf, wobei die genaue Beschreibung der Methoden nicht Gegenstand dieser Arbeit ist:

- Quantitative MRT-Untersuchungen konnten keinen signifikanten Unterschied im histologischen Mankin-Score 0-4 vs. 5-8, 5-8 vs. 9-10 und 5-8 vs. 11-14 nachweisen [96].
- Diffraction-Enhanced Synchrotron X-Ray Imaging (DEI) - Untersuchungen in einem Teilchenbeschleuniger zeigten signifikante Unterschiede im OARSI-Stadium 0 vs. 2 (mod. Collins-Score 0 vs. 2), wenngleich ein flächendeckender Einsatz aufgrund der Notwendigkeit eines zur Verfügung stehenden Teilchenbeschleunigers fraglich erscheint [97].
- Untersuchungen mittels Optischer Kohärenztomografie (OCT) konnten einen signifikanten Unterschied zwischen Mankin-Score 1-2 vs. 5-8 nachweisen [98].
- Messungen mit dem Verfahren der Ultraschall-Indentation konnten signifikante Unterschiede zwischen OARSI-Stadium 1 und 2 vs. 3 aufzeigen [99].

- Ultraschall-Untersuchungen stellten an explantierten Femurcondylen von Osteoarthrosepatienten signifikante Unterschiede von fast normalem Knorpel (Mankin 0 bis <2) vs. früher Arthrose (Mankin 2 bis <6) und vs. ausgeprägter Arthrose (6 bis <10) fest [100].
- Unter Anwendung der Spektrometrie konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Mankin-Stadium 0-1 vs. 2-3 aufgezeigt wurden [101].
- Veränderungen in der räumlichen Organisation der superfiziellen Chondrozyten werden als Biomarker für früh-osteoarthrotische Degenerationen angesehen [102,103].

Eine objektive vergleichende Bewertung der angeführten Verfahren erscheint hierbei nur eingeschränkt möglich. Dennoch lässt sich feststellen, dass alle experimentellen Methoden in der Lage sind, Schädigungen im OARSI-Stadium II und somit in einem relativ frühen Schädigungsstadium der Knorpeloberfläche (Fibrillierungen) zu detektieren – und damit theoretisch früher, als mit den in Anwendung befindlichen klinischen Verfahren Röntgen und MRT. Allerdings fehlten in den experimentellen Verfahren standardisierte Vergleiche der Messwerte für unterschiedliche Knorpelproben, die sich histologisch abgesichert in unterschiedlichen Stadien der Arthrose befanden. Eine Aussage darüber wie „früh“ eine einzelne Methode eine (auch erst in frühen Stadien der Entwicklung befindliche) Osteoarthrose anzeigt, lässt sich daher nicht treffen. Wünschenswert wäre es jedoch, ein Diagnostikum zu etablieren, das Knorpelschädigungen bereits im Stadium I nach OARSI aufdeckt, da hier mangels irreversiblen Schaden an der oberflächlichen Knorpelstruktur (OARSI Stadium II und höher) gegebenenfalls noch eine Regeneration des Knorpels (im besten Fall ad integrum) erfolgen könnte.

Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, dass die zur Verfügung stehenden klinisch angewandten und auch die meisten in experimenteller Entwicklung stehenden Verfahren zur Diagnostik der Osteoarthrose erst ab OARSI-Stadium II und damit erst mit Eintreten von strukturellen Schäden das Vorliegen von Veränderungen des Gelenkknorpels zu detektieren vermögen. Ein Tool, das vermag, Veränderungen der Knorpelqualität bereits im OARSI-Stadium I zuverlässig und nicht-destruktiv aufzuzeigen, wäre in diesem Kontext sehr vielversprechend. Ein solches Diagnostikum könnte durch die statistische Analyse der räumlichen Verteilung der superfiziellen Chondrozyten verwirklicht werden. Aus diesem Grund hat die vorliegende Arbeit ein Panel an 5 Parametern der räumlichen Organisationsanalyse identifiziert und verwendet, um Proben mit der globalen REM-visuellen Einteilung Grad 1 gegen Proben mit der globalen REM-visuellen Einteilung Grad 2 zu testen. Dies wurde durchgeführt, da die hier verwendete Definition der globalen REM-visuellen Einteilung Grad 1 im Wesentlichen dem OARSI Grad 0 und Definition der globalen REM-visuellen Einteilung Grad 2 im Wesentlichen dem OARSI Grad 1 entspricht. Einschränkender Weise muss allerdings erwähnt werden, dass diese Einschätzung auf unserer Interpretation der Definitionen des OARSI-Grades und der globalen REM-visuellen Einteilung beruht und eine Folgestudie zu diesem Thema hilfreich wäre. Der statistische Vergleich von Proben mit einer globalen REM-visuellen Einteilung Grad 1

vs. 2 ergab mit dem in dieser Arbeit identifizierten Parameter-Panel, dass 92,80% der analysierten Proben statistisch signifikant voneinander unterschieden werden konnten. Dies entspricht in der eigenen Interpretation einer statistischen Unterscheidung von Proben mit OARSI-Grad 0 vs. 1. Da jedoch die OARSI-Klassifikation auf histologischen Schnitten in der klassischen vertikalen Orientierung beruht und somit eine sehr lokale Klassifikation der Knorpeloberfläche nur in der Schnittebene abbildet, aber die REM-Abbildung von 1x1 cm² großen Knorpeloberflächen einen globaleren Eindruck des strukturellen Schadens ergeben, konnte die vorliegende Arbeit an relativ gesehen großen Arealen insgesamt zeigen, dass Parameter der räumlichen Organisationsanalyse a) Proben mit intakter Oberfläche vs. unebener Oberfläche mit Fibrillationen in 92,8% der Fälle statistisch voneinander unterschieden werden konnten, und b) dass Veränderungen der räumlichen Organisation REM-visualisierten strukturellen Schäden der Knorpeloberfläche vorangehen können. Gerade der letzte Punkt erklärt, warum die übrigen 7,2% statistisch nicht erfolgreich voneinander unterschieden werden konnten: der Unterschied zwischen Proben mit intakter Oberfläche vs. unebener Oberfläche mit Fibrillationen wurde anhand räumlicher Organisationsparameter getestet, die aber gerade in den REM-visualisiert intakten Oberflächen bereits pathologisch verändert waren (UZA1 vs. LKA1 und MRA1 vs. HSC1), da Veränderungen der räumlichen Organisation den REM-visualisierten strukturellen Schäden der Knorpeloberfläche vorangingen. Dieser Punkt erklärt auch, weshalb Proben mit intakter Knorpeloberfläche vs. unebener Oberfläche mit Fibrillationen erstmalig statistisch erfolgreich voneinander unterschieden werden konnten: relativ geringe Unterschiede in der Intaktheit der Knorpeloberflächen gingen mit prominenten und deutlich diagnostifizierbaren Veränderungen in der räumlichen Organisation einher. Dieser Punkt illustriert das Potential der räumlichen Organisation als Bild-basierter Biomarker zur Frühdiagnose der Osteoarthrose.

5. Zusammenfassung

Die Diagnose früher struktureller Veränderungen im Gelenkknorpel ist nach wie vor ein klinisches Problem. In diesem Kontext ist die Organisation der Chondrozyten als bildbasierter Biomarker zur Feststellung früher struktureller und/oder degenerativer Veränderungen prinzipiell geeignet. Dieser Biomarker beruht bisher im Wesentlichen auf einer subjektiven Klassifizierung der Verteilungsmuster der oberflächennahen Chondrozyten. Mit dieser Arbeit sollten Fragen zur methodischen Weiterentwicklung der Verwendung der räumlichen Organisation der superfiziellen Chondrozyten als bildbasierter Biomarker beantwortet werden.

Hierzu wurden Proben (n=16) aus der Knorpeloberfläche von humanen Femurcondylen zunächst makroskopisch-visuell nach Schädigungsgrad klassifiziert und im Anschluss elektronen- und fluoreszenzmikroskopisch aufgearbeitet. Neben der Erfassung weiterer optisch-visueller Scores incl. des räumlichen Verteilungsmusters der oberflächlichen Chondrozyten erfolgt auch die Bestimmung von quantitativen Messparametern, wobei durch exakte Übereinanderlagerung der REM- und der fluoreszenzmikroskopischen Bilder, ein Vergleich sowohl global über die ganze Probe hinweg, wie auch lokal in einzelnen kleinen Ausschnitten innerhalb der Probe zu ermöglicht wurde.

Veränderungen der räumlichen Organisation der superfiziellen Chondrozyten waren dabei bereits im visuell-makroskopisch- und rasterelektronenmikroskopisch intakten Knorpelproben zu finden. Eine lokale Betrachtungsweise der Proben schien dabei der globalen überlegen. Es konnte ein Panel an quantitativen und qualitativen Messparametern der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten bestimmt werden, das gegenüber REM-Untersuchungen verlässlich dazu geeignet ist, Schäden der Knorpeloberfläche anzuzeigen. Dabei gingen relativ geringe Unterschiede in der Intaktheit der Knorpeloberflächen in der REM mit prominenten und deutlich diagnostifizierbaren Veränderungen in der räumlichen Organisation einher. Proben mit REM intakter Knorpeloberfläche vs. REM-unebener Oberfläche mit Fibrillationen konnten durch Untersuchungen der räumlichen Organisation der superfiziellen Chondrozyten erstmalig statistisch erfolgreich voneinander unterschieden werden.

Damit könnte die visuelle Klassifikation der räumlichen Organisation der superfiziellen Chondrozyten ein besonders wichtiges Kriterium in der Früh-Diagnose von osteoarthrotischen Veränderungen von Gelenken sein, bestenfalls bereits im histologischen OARSI-Stadium I.

6. Literatur-Verzeichnis

1. Rabenberg, M., Robert-Koch-Institut (Hrsg). (2013): Gesundheitsberichtserstattung des Bundes, Heft 54, Arthrose, S. 7
2. Rabenberg, M., Robert-Koch-Institut (Hrsg). (2013): Gesundheitsberichtserstattung des Bundes, Heft 54, Arthrose, S. 22-24
3. Zacher J., Gursche A (2001) Diagnostik der Arthrose. Orthopäde 30 (11): 841–847
4. Orth, P., Madry, H. (2016): Degenerative Kniegelenkerkrankungen – Gonarthrose. Orthopädie und Unfallchirurgie up2date; 11(02): 81-98; DOI: 10.1055/s-0041-108361
5. Arnscheidt C, Meder A, Rolauffs B.: Frühdiagnose der Arthrose: klinische Realität und experimentelle Pipeline; [Early Diagnosis of Osteoarthritis: Clinical Reality and Promising Experimental Techniques].Z Orthop Unfall. 2016 Jun;154(3):254-68. doi: 10.1055/s-0042-100478. Epub 2016 Feb 19.
6. Mankin HJ, Lippiello L. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. J Bone Joint Surg Am 1970; 52: 424-434
7. Waldstein W, Perino G et al. OARSI osteoarthritis cartilage histopathology assessment system: A biomechanical evaluation in the human knee. J Orthop Res. 2016 Jan;34(1):135-40. doi: 10.1002/jor.23010. Epub 2015 Aug 27.
8. Rabenberg, M., Robert-Koch-Institut (Hrsg). (2013): Gesundheitsberichtserstattung des Bundes, Heft 54, Arthrose, S. 10-14
9. Stöve J et al. Gonarthrose. Sk2-Leitlinie der AWMF, Register-Nr. 033-004: 33-57, Stand 18.01.2018.
10. Stöve J et al. Gonarthrose. Sk2-Leitlinie der AWMF, Register-Nr. 033-004: 6-7, Stand 18.01.2018.
11. Drenckhahn, D., Eckstein, F. (2003): Untere Extremität. In: Drenckhahn, D. (Hrsg.): Anatomie. Urban & Fischer, München: 374

12. Platzer, W. (2005): Untere Extremität, Taschenatlas der Anatomie, Band 1: Bewegungsapparat., 9. Aufl., Thieme, Stuttgart: 194; 206-213
13. Schünke et al.,(2005): Prometheus – Lernatlas der Anatomie, Allg. Anatomie und Bewegungssystem, Thieme, Stuttgart: 370, 390-401
14. http://test.classconnection.s3.amazonaws.com/27/flashcards/50027/png/label_anterior_view_of_knee_joint.png (Abrufdatum: 24.03.13)
15. Ulfig, N. (2011): Kurzlehrbuch Histologie, 3. Aufl., Thieme, Stuttgart: S.42
16. Mansfield JC, et al (2008): Collagen fibre arrangement in normal and diseased cartilage studied by polarization sensitive nonlinear microscopy. J Biomed Opt 13(4): 1-13
17. Poole CA (1997): Articular cartilage chondrons: form, function and failure. Journal of Anatomy, 191(Pt 1): 1-13
18. Rolauffs B et al (2009): Regenerative Medizin zur Behandlung von Knorpelschäden, Orthopädie und Unfallchirurgie up2date 2009; 4(5): 339-354.
19. Goldring MB et al (2009): Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. Arthritis Res Ther. 11(39): 224
20. Martinek V (2003): Anatomie und Pathophysiologie des hyalinen Knorpels. Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin, 6: 166-170
21. Wirth, C., Mutschler, W. (2009): 2. Aufl., Thieme, Stuttgart: 9
22. Cochrane, V.B. (1988): Orthopädische Biomechanik, Enke, Stuttgart
23. International Cartilage Repair Society, <http://www.cartilage.org/?pid=22>, (Abrufdatum 29. Aug. 2014)
24. Milner PI, Wilkins RJ, Gibson JS: Cellular physiology of articular cartilage in health and disease. Rothschild, BM (editor): Principles of osteoarthritis. Rijeka, InTech: S. 567-578 (2012)
25. Rolauffs, B. et al (2009): Regenerative Medizin zur Behandlung von Knorpelschäden, Unfallchirurgie & Orthopädie Up2Date 4(05), Thieme, Stuttgart: 339-354
26. Schiebler, T. (2005): Anatomie, 9.Aufl., Springer, Heidelberg: 40-41; 46-49

27. Wirth, C., Mutschler, W. (2009): Praxis der Orthopädie und Unfallchirurgie. 2. Aufl., Thieme, Stuttgart: 8-10
28. Quinn, T.M., E.B. Hunziker & H.J. Hauselmann (2005): Variation of cell and matrix morphologies in articular cartilage among locations in the adult human knee. *Osteoarthritis Cartilage*, 13(8). S. 672-78
29. Broom, N.D., Marra, D.L. (1985): New structural concepts of articular cartilage demonstrated with a physical model. *Connect Tissue Res (GB)*, 14(1): 1-8
30. Glaser, C, Putz, R (2002): Functional anatomy of articular cartilage under compressive loading. Quantitative aspects of global, local and zonal reactions of the collagenous network with respect to the surface integrity. *Osteoarthritis Cartilage*, 10(2): 83-99
31. Kim, A.C., Spector, M. (2000): Distribution of chondrocytes containing alpha-smooth muscle actin in human articular cartilage. *J Orthop Res*, 18: 749-755
32. Eger, W., et al. (2002): Human knee and ankle cartilage explants: catabolic differences. *J Orthop Res*, 20: 526-534
33. Rolaufts, B., et al. (2008): Distinct horizontal patterns in the spatial organization of superficial zone chondrocytes of human joints. *J Struct Biol*, 162(2): 335-44
34. Sun, Y. et al. (2000): Serum uric acid an patterns of radiographic osteoarthritis. The Ulm Osteoarthritis Study. *Scand J Rheumatol* 29: 380-386
35. Stürmer, T. et al (1998): Serum cholesterol an osteoarthritis. The baseline examination of The Ulm Osteoarthritis Study. *J Rheumatol* 25: 1827-1832
36. Stürmer, T. et al (2001): Noninsulin dependent diabetes mellitus an patterns of osteoarthritis. The Ulm Osteoarthritis Study. *Scand J Rheumatol*: 30: 169-171
37. Madry, H., Luyten, F.P. & Facchini, A. (2011): Biological aspects of early osteoarthritis. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy. Official journal of the ESSKA*. S. 407-422
38. Murray, C.J.L, Lopez, A.D. (1996): The global burden of disease. A comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020. *Global Burden of Disease and Injury Series, Vol. 1*. Cambridge, MA: Harvard University Press

39. Woolf, A.D., Pfleger, B. (2003): Burden of major musculoskeletal conditions. *Bulletin of the World Health Organization*, 81(9): 646-656
40. Robert Koch-Institut (Hrsg) (2012) Daten und Fakten: Ergebnisse der Studie »Gesundheit in Deutschland aktuell 2010«. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. RKI, Berlin
41. Bundesministerium für Gesundheit (2013) GKV-Statistik KG8 (Krankheitsartenstatistik der gesetzlichen Krankenversicherung) Arbeitsunfähigkeitsfälle und -tage aufgrund von Arthrose; Sonderauswertung
42. Statistisches Bundesamt (2012) Krankheitskostenrechnung, Krankheitskosten nach Alter und Geschlecht. www.gbe-bund.de (Stand: 01.06.2013)
43. Orth, P., Madry, H. (2013): Konservative Therapie der Arthrose. *Orthopädie und Unfallchirurgie up2date*. 8/2013: 419-436. DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1346698>
44. <http://www.sporthopaedicum.de/fachbereiche/knie/arthrose.html?id=127>. (Abrufdatum 09.10.2014)
45. Sandell, L.J., Aigner, T. (2001): Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res*, 3(2): 107-13
46. Hamerman, D. (1989): The biology of osteoarthritis. *N Engl J Med*, 320(20): 1322-1330
47. Fukui, N., et al. (2008): Regional differences in chondrocyte metabolism in osteoarthritis: a detailed analysis by laser capture microdissection. *Arthritis Rheum*, 58(1): 154-163
48. Sato, T., et al. (2006): Comparative analysis of gene expression profiles in intact and damaged regions of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis and rheumatism*, 54(3): 808-817
49. Geyer, M., et al. (2009): Differential transcriptome analysis of intraarticular lesional vs intact cartilage reveals new candidate genes in osteoarthritis pathophysiology. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*, 17(3): 328-35
50. Rolauffs, B., et al. (2010): Vulnerability of the superficial zone of immature articular cartilage to compressive injury. *Arthritis Rheum*, 62(10): 3016-3027

51. Rolauffs, B., et al. (2011): Onset of preclinical osteoarthritis: The angular spatial organization permits early diagnosis. *Arthritis and rheumatism*, 63(6). S. 1637-1647
52. Unveröffentlichte Abbildung der Arbeitsgruppe Rolauffs, B. am Siegfried-Weller-Institut für Unfallmedizinische Forschung der BG Unfallklinik Tübingen
53. Zak, L. et al (2014): Results 2 Years After Matrix-Associated Autologous Chondrocyte Transplantation Using the Novocart 3D Scaffold: An Analysis of Clinical and Radiological Data. *Am J Sports Med*. 2014 May 9;42(7): 1618-1627
54. Y. Wang et al (2006): Factors affecting progression of knee cartilage defects in normal subjects over 2 years. *Rheumatology* 45, 2006, S. 79–84
55. Mandelbaum, B. R., Browne, J. E., Fu, F., Micheli, L., Mosely, J. B., Jr., Erggelet, C., Minas, T. and Peterson, L. (1998) Articular cartilage lesions of the knee. *Am J Sports Med*, 26(6): 853-61
56. Steadman, J. R., Briggs, K. K., Rodrigo, J. J., Kocher, M. S., Gill, T. J. and Rodkey, W. G. (2003): Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up. *Arthroscopy*, 19(5): 477-84
57. Peterson, L., Brittberg, M., Kiviranta, I., Akerlund, E. L. and Lindahl, A. (2002): Autologous chondrocyte transplantation. *Biomechanics and long-term durability*. *Am J Sports Med*, 30(1) 2-12
58. Peterson L. et al. (2010): Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up. *Am J Sports Med*. 2010; 38(6): 1117-1124
59. Biant LC, Bentley G, Vijayan S, Skinner JA, Carrington RW. (2014): Long-term results of autologous chondrocyte implantation in the knee for chronic chondral and osteochondral defects. *Am J Sports Med*. 2014 Sep; 42(9): 2178-83
60. Aldrian, S. et al (2014): Clinical and Radiological Long-term Outcomes After Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Transplantation: A Prospective Follow-up at a Minimum of 10 Years. *Am J Sports Med*. 2014 Nov; 42(11): 2680-8
61. Mithoefer, K., Della Villa, S. (2012) Return to Sports after Articular Cartilage Repair in the Football (Soccer) Player. *Cartilage* 3 (Suppl. 1) 57S-62S
62. Sanz-Ramos P, Duart J, Rodríguez-Goñi MV, Vicente-Pascual M, Dotor J, Mora G, Izal-Azcárate I. Improved Chondrogenic Capacity of Collagen

Hydrogel-Expanded Chondrocytes: In Vitro and in Vivo Analyses. *J Bone Joint Surg Am.* 2014 Jul 2;96(13): 1109-1117

63. Niemeyer P et al. Stellenwert der matrixaugmentierten Knochenmarkstimulation in der Behandlung von Knorpelschäden des Kniegelenks: Konsensusempfehlungen der AG Klinische Geweberegeneration der DGOU. *Z Orthop Unfall* 2018; 156(05): 513-532. DOI: 10.1055/a-0591-6457
64. Laudy, A.B., Bakker, E.W., Rekers, M., Moen, M.H. (2014): Efficacy of platelet-rich plasma injections in osteoarthritis of the knee: a systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med* 2014 Nov 21
65. Kon, E. et al. (2011): Platelet-rich plasma intra-articular injection versus hyaluronic acid viscosupplementation as treatments for cartilage pathology: from early degeneration to osteoarthritis. *Arthroscopy* 2011 Nov; 27(11): 1490-501.
66. Stöve J et al. Gonarthrose. Sk2-Leitlinie der AWMF, Register-Nr. 033-004: 20-32, Stand 18.01.2018.
67. Ayhan, E., Kesmezacar, H., Akgun, I. (2014): Intraarticular injections (corticosteroid, hyaluronic acid, platelet rich plasma) for knee osteoarthritis. *World J Orthop* 2014; 5(3) 351-361.
68. Outerbridge RE. The etiology of chondromalazia patellae. *J BoneJoint Surg Br* 1961; 43: 752-757
69. https://cartilage.org/content/uploads/2014/10/ICRS_evaluation1-1.pdf; (Abrufdatum 12.05.2019)
70. https://cartilage.org/content/uploads/2014/10/Fig_5.1_proof.pdf; (Abrufdatum 12.05.2019)
71. Firma Zeiss, Laser Scanning Microscope LSM 501 Produktbeschreibung, Seite 4
72. Unveröffentlichte Abbildung der Arbeitsgruppe Rolaufts, B. am Siegfried-Weller-Institut für Unfallmedizinische Forschung der BG Unfallklinik Tübingen
73. Abbildung von Mathematisch-naturwissenschaftlicher Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Fachbereich Physik: <https://uni-tuebingen.de/fakultaeten/mathematisch-naturwissenschaftliche-fakultaet/fachbereiche/physik/institute/physikalisches->

institut/bereiche/festkoerperphysik/forschung/technologie/fabrikation-und-analytik/rem/ (Abrufdatum: 12.05.2019)

74. Haralick, R. M., Shanmugam, K., and Dinstein, I. (1973): Texture parameters for image classification, IEEE Trans SMC 3: 610-621
75. Julio E Cabrera (2005):
http://rsweb.nih.gov/ij/plugins/download/GLCM_Texture.java
76. <http://www.fp.ucalgary.ca/mhallbey/asm.htm>; Abrufdatum 16.10.2014
77. <http://www.fp.ucalgary.ca/mhallbey/contrast.htm>; Abrufdatum 16.10.2014
78. <http://www.fp.ucalgary.ca/mhallbey/correlation.htm>; Abrufdatum 16.10.2014
79. <http://www.fp.ucalgary.ca/mhallbey/homogeneity.htm>; Abrufdatum 16.10.2014
80. <http://www.fp.ucalgary.ca/mhallbey/entropy.htm>; Abrufdatum 16.10.2014
81. Clark, P.J. and Evans, F.C. (1954) Distance to nearest neighbour as a measure of spatial relationships in populations Ecology 35, 445-453
82. Felka T, Rothdiener M, Bast S, Uynuk-Ool T, Zouhair S, Ochs BG, De Zwart P, Stoeckle U, Aicher WK, Hart ML, Shiozawa T, Grodzinsky AJ, Schenke-Layland K, Venkatesan JK, Cucchiari M, Madry H, Kurz B, Rolauffs B.: Loss of spatial organization and destruction of the pericellular matrix in early osteoarthritis in vivo and in a novel in vitro methodology. Osteoarthritis Cartilage. 2016 Jul;24(7):1200-9. doi: 10.1016/j.joca.2016.02.001. Epub 2016 Feb 12
83. Donnelly, K. (1978): Simulations to determine the variance and edge-effect of total nearest neighbour distance. In I. Hodder (ed.) Simulation studies in archaeology, Cambridge/New York: Cambridge University Press, 91-95
84. Biber, Peter (1997): Analyse verschiedener Strukturaspekte von Waldbeständen mit dem Wachstumssimualtor Silva 2; Lehrstuhl für Waldwachstumskunde, LMU München
85. SigmaPlot ®
86. Custers RJ, Creemers LB, Verbout AJ et al. Reliability, reproducibility and variability of the traditional Histologic/Histochemical Grading System vs the new OARSI Osteoarthritis Cartilage Histopathology Assessment System. Osteoarthritis Cartilage 2007; 15: 1241-1248

87. Ostergaard K, Petersen J, Andersen CB et al. Histologic/histochemical grading system for osteoarthritic articular cartilage: reproducibility and validity. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1766-1771
88. Ostergaard K, Andersen CB, Petersen J et al. Validity of histopathological grading of articular cartilage from osteoarthritic knee joints. *Ann Rheum Dis* 1999; 58: 208-213
89. Saal A, Gaertner J, Kuehling M et al. Macroscopic and radiological grading of osteoarthritis correlates inadequately with cartilage height and histologically demonstrable damage to cartilage structure. *Rheumatology international* 2005; 25: 161-168
90. Bendele AM, Hulman JF. Effects of body weight restriction on the development and progression of spontaneous osteoarthritis in guinea pigs. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 1180-1184
91. Colombo C, Butler M, Hickman L et al. A new model of osteoarthritis in rabbits. II. Evaluation of anti-osteoarthritic effects of selected antirheumatic drugs administered systemically. *Arthritis Rheum* 1983; 26: 1132-1139
92. Foland JW, McIlwraith CW, Trotter GW et al. Effect of betamethasone and exercise on equine carpal joints with osteochondral fragments. *Veterinary surgery : VS* 1994; 23: 369-376
93. Yagi R, McBurney D, Laverty D et al. Intrajoint comparisons of gene expression patterns in human osteoarthritis suggest a change in chondrocyte phenotype. *J Orthop Res* 2005; 23: 1128-1138
94. Custers RJ, Creemers LB, Verbout AJ et al. Reliability, reproducibility and variability of the traditional Histologic/Histochemical Grading System vs the new OARSI Osteoarthritis Cartilage Histopathology Assessment System. *Osteoarthritis Cartilage* 2007; 15: 1241-1248
95. Palmer AJ, Brown CP, McNally EG et al. Non-invasive imaging of cartilage in early osteoarthritis. *The bone & joint journal* 2013; 95-B: 738-746
96. Bittersohl B, Hosalkar HS, Miese FR et al. Zonal T2* and T1Gd assessment of knee joint cartilage in various histological grades of cartilage degeneration: an observational in vitro study. *BMJ open* 2015; 5: e006895

- 97.** Muehleman C, Li J, Connor D et al. Diffraction-enhanced imaging of musculoskeletal tissues using a conventional x-ray tube. *Academic radiology* 2009; 16: 918-923
- 98.** Pilge H, Huber-van der Velden K, Herten M et al. Comparison of hip joint cartilage degeneration assessed by histology and ex vivo optical coherence tomography. *Orthopedic reviews* 2014; 6: 5342
- 99.** Wang Y, Huang YP, Liu A et al. An ultrasound biomicroscopic and water jet ultrasound indentation method for detecting the degenerative changes of articular cartilage in a rabbit model of progressive osteoarthritis. *Ultrasound Med Biol* 2014; 40: 1296-1306
- 100.** Nishitani K, Kobayashi M, Kuroki H et al. Ultrasound can detect macroscopically undetectable changes in osteoarthritis reflecting the superficial histological and biochemical degeneration: ex vivo study of rabbit and human cartilage. *PloS one* 2014; 9: e89484
- 101.** Afara I, Prasadam I, Crawford R et al. Non-destructive evaluation of articular cartilage defects using near-infrared (NIR) spectroscopy in osteoarthritic rat models and its direct relation to Mankin score. *Osteoarthritis Cartilage* 2012; 20: 1367-1373
- 102.** Aicher WK, Rolauffs B. The spatial organisation of joint surface chondrocytes: review of its potential roles in tissue functioning, disease and early, preclinical diagnosis of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2014; 73: 645-653
- 103.** Rolauffs B, Williams JM, Aurich M et al. Proliferative remodeling of the spatial organization of human superficial chondrocytes distant from focal early osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 489-498

7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik Tübingen, Abteilung Siegfried-Weller-Institut für Unfallmedizinische Forschung unter Betreuung von Univ. Prof. Dr. Bernd Rolauffs durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch und in Zusammenarbeit mit Univ. Prof. Dr. Bernd Rolauffs, ehemals Oberarzt der Klinik und stellvertretender Leiter des Siegfried-Weller-Instituts für Unfallmedizinische Forschung der BG Unfallklinik Tübingen, jetzt Direktor des Zentrums für Gewebeersatz, Regeneration & Neogenese (GERN) der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie des Universitäts-Klinikums Freiburg.

Die Untersuchungen wurden am Zentrum für Medizinische Forschung in Tübingen nach Einarbeitung durch Univ. Prof. Dr. Bernd Rolauffs und Dr. Tino Felka von mir eigenständig, in Zusammenarbeit und mit Unterstützung durch Univ. Prof. Dr. Bernd Rolauffs und Dr. Tino Felka durchgeführt. Die Elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Knorpelproben wurden am Anatomischen Institut der Universität Kiel (Prof. Dr. Bodo Kurz) angefertigt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig in Zusammenarbeit mit Univ. Prof. Rolauffs durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig bzw. nach Anleitung durch Prof. Rolauffs verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Schwäbisch Hall, den 07.06.2019

Klaus Böhme

8. Danksagung

An Eva – mit endlosem Dank für Deine Liebe, Deine Geduld, Deine unentwegte Unterstützung, Deinen Rat und Deine Motivation. Du bist unglaublich. Ich liebe Dich ganz unendlich.

An Henry und Romy – Ihr werdet so schnell groß und Ihr seht mich viel zu selten. Ich bin in Gedanken immer bei Euch und jedes Mal überkommt mich dabei unendliche Freude und Glück – Danke Euch hierfür! Ich bin immer für Euch da.

An meine Eltern Ursula und Hartmut – Danke für Euren unerschütterlichen Glauben an mich und Eure immerwährende Unterstützung.

An meine kleine Schwester Melanie – Danke für´s immer-da-sein.

An meine Schwiegereltern, meine Schwäger, meine Neffen – Danke für´s „Familie sein“, zu der ich immer kommen darf.

An Bernd Rolauffs – Ohne Dich und Deine endlose Geduld, Deine Unterstützung, Deine Zeit auch zur Unzeit und Deinen fortlaufenden Rat wäre diese Arbeit nie zustande gekommen.

Für alle direkt und indirekt Beteiligten am Zentrum für Medizinische Forschung in der Waldhörnlestraße in Tübingen, am Siegfried-Weller-Institut in Tübingen, am G.E.R.N in Freiburg und speziell auch an Prof. Bodo Kurz in Kiel – Danke für Mitwirkung, Mitarbeit, Tipps und Tricks, Anleitung, Information, Austausch und nicht zu vergessen den Kaffee! Ohne diese Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.