

Entwicklung eines Messsystems zur Untersuchung arthrotischer  
Knorpelschäden mittels naher Infrarot-Spektroskopie für den  
Einsatz in der Arthroskopie

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktoringenieur (Dr.-Ing.)

vorgelegt der Fakultät für Maschinenbau  
der Technischen Universität Ilmenau

von Dipl.-Ing. Holger Plettenberg  
geboren am 22. Dezember 1970 in Würzburg

1. Gutachter: Prof. Dipl.-Ing. Dr. med. (habil) . H. Witte
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. G. O. Hofmann
3. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. E. Koch

Tag der Einreichung: 24.05.2007

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 24.03.2009

urn:nbn:de:gbv:ilm1-2009000062

Just because you feel it doesn't mean it's there

aus *There There* von *Radiohead*

## Zusammenfassung

Arthrose ist die häufigste Erkrankung des Knorpels großer Gelenke und stellt eine enorme soziale und ökonomische Belastung für die Allgemeinheit und einen hohen Leidensdruck für den Patienten dar. Die zerstörungsfreie Diagnose von Ort und Schwere des Knorpelschadens, insbesondere in den primären Stadien, ist eine offene klinische Fragestellung. Als Goldstandard der Diagnose gilt z. Z. der optische Eindruck und das Betasten (Palpieren) des Knorpels während einer Arthroskopie *in vivo*.

Diese Arbeit beschreibt ein Messsystem zur Diagnose von Arthrose auf Basis der nahen Infrarot (NIR) Spektroskopie und mehrere Experimente zum Nachweis der Eignung dieser Technologie. Es wird gezeigt, dass pathologische Veränderungen von Knorpelgewebe sich in den entsprechenden NIR-Spektren abzeichnen, dass die Aussagekraft der NIR-Spektroskopie vergleichbar ist mit der von klassischen medizinischen Laborverfahren, dass die biomechanischen Eigenschaften von Knorpel mit seinen optischen korrelieren und dass die während der Messung auftretenden Druckbelastung auf den Knorpel dessen Spektren nicht verändern.

## Abstract

Osteoarthritis (OA) is one of the most prevalent diseases of cartilage in the great joints, with enormous social and economic burden on the society and strong pain for the patient. A non-destructive method for diagnosis of the extent and localization of OA is not available so far. Up to now the gold standard for diagnosis of OA is the visual impression and the mechanical feedback from palpation of the cartilage during arthroscopy.

This work describes a measurement system based on near infrared spectroscopy and several experiment to prove the feasibility of NIR spectroscopy as a diagnostic method for OA. The results show that pathological changes in

cartilage lead to corresponding changes in the respective spectra, that the diagnostic power of NIR spectroscopy is comparable with those of classical medical laboratory methods, that the biomechanical properties of cartilage correlate with its spectral properties and that the pressure, as exerted during the measurements, does not change the spectral properties of cartilage.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. Einleitung</b> . . . . .	5
<b>2. Propädeutik</b> . . . . .	7
2.1 NIR-Spektroskopie . . . . .	7
2.1.1 Methoden und Geräte in der NIR-Spektroskopie . . . . .	13
2.1.2 Datenverarbeitung . . . . .	15
2.1.3 Anwendungsfelder . . . . .	20
2.2 Arthrose . . . . .	22
2.2.1 Gelenkknorpel . . . . .	22
2.2.2 Krankheitsverlauf . . . . .	25
2.2.3 Diagnostik . . . . .	26
2.2.4 Therapie . . . . .	33
2.3 Entwicklungsbedarf und Aufgabenstellung . . . . .	36
2.3.1 Identifikation des Entwicklungsbedarfs . . . . .	37
2.3.2 Ableitung der Aufgabenstellung . . . . .	37
<b>3. Material und Methoden</b> . . . . .	39
3.1 Vorversuche . . . . .	39
3.1.1 Machbarkeitsabschätzung . . . . .	39
3.1.2 UV-VIS-Spektroskopie . . . . .	40
3.2 Geräteentwicklung . . . . .	41
3.2.1 Spektrometersystem . . . . .	42

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>4</b>
3.2.2 Sonde . . . . .	45
3.2.3 Software . . . . .	47
3.2.4 Systemsicherheit . . . . .	50
3.3 Verfahrensentwicklung . . . . .	51
3.3.1 Untersuchung von Knorpelimplantaten . . . . .	51
3.3.2 Untersuchungen am Schafsmodell . . . . .	52
3.4 Biomechanische Versuche . . . . .	56
3.4.1 Vergleich mechanischer Eigenschaften und NIR-Reflexion	56
3.4.2 NIR-Reflexion unter Druckbelastung . . . . .	60
<b>4. Ergebnisse</b> . . . . .	<b>64</b>
4.1 Vorversuche . . . . .	64
4.1.1 Machbarkeitsabschätzung . . . . .	64
4.1.2 UV-VIS-Spektroskopie . . . . .	66
4.2 Verfahrensentwicklung . . . . .	70
4.2.1 Systemsicherheit . . . . .	70
4.2.2 Untersuchung von Knorpelimplantaten . . . . .	72
4.2.3 Untersuchungen am Schafsmodell . . . . .	73
4.3 Biomechanische Versuche . . . . .	82
4.3.1 Vergleich mechanischer Eigenschaften und NIR-Reflexion	82
4.3.2 NIR-Reflexion unter Druckbelastung . . . . .	85
<b>5. Zusammenfassung und Ausblick</b> . . . . .	<b>89</b>

# 1. EINLEITUNG

Die Arthrose ist weltweit die häufigste Erkrankung großer Gelenke mit einer enormen soziologischen und ökonomischen Belastung für die Allgemeinheit und einem hohen Leidensdruck für den Patienten [30]. Auch aus diesem Grund hat die WHO dieses Jahrzehnt den Erkrankungen des Stütz- und Bewegungsapparates gewidmet. Die Neuerkrankungsrate in Europa liegt bei ca. 1 % der Bevölkerung, und bei über 8 % der Menschen zwischen 50 und 80 Jahren zeigt sich eine klinisch symptomatische Arthrose [30]. In Deutschland gehen ca. 30 Millionen Arztkonsultationen auf degenerative Gelenkerkrankungen zurück. Allein 1995 waren etwa 50 Millionen Arbeitsausfalltage und mehr als 5 Millionen Krankenhaustage darauf zurückzuführen [86].

Die Pathogenese der Arthrose ist noch nicht vollständig geklärt, und so stehen dem Mediziner zur Zeit keine Methoden zur zweifelsfreien Diagnose der Arthrose, speziell frühzeitiger Stadien, zur Verfügung. Zur Beurteilung von Gelenkknorpel werden gegenwärtig vor allem die Arthroskopie, biochemische Marker sowie Röntgen- und Kernspinverfahren eingesetzt. Trotz der Tatsache, dass es sich bei der Arthroskopie um einen invasiven Eingriff handelt, stellt diese Methode den „Goldstandard“ bei der Beurteilung von Knorpelkrankheiten dar [27]. Bei der Beurteilung während einer Arthroskopie stützt sich der Arzt auf die optische Information aus dem Arthroskop und den haptischen Eindruck, den er bei der Untersuchung mittels eines Tasthakens im Gelenk gewinnt. Diese beiden Informationspfade bilden die Grundlage der meisten Beurteilungsschemata für Knorpelschäden, ohne dabei von unabhängigen Messwerten, z. B. der Zusammensetzung des Knorpels, gestützt zu werden.

Auch wenn nicht invasive bildgebende Verfahren ihre Aussagekraft in Hinblick auf die Diagnose von Knorpelschäden steigern konnten, werden sie Ar-

throskopien in naher Zukunft nicht ersetzen können. In diesem Bereich besteht großer Bedarf an einem Verfahren, das den Chirurg während des Eingriffs bezüglich Diagnose, Lokalisation und Dokumentation von Knorpelschäden unterstützt. Ein solches Verfahren kann der Therapiekontrolle und der Neuentwicklung wesentliche Impulse geben. Es hat jedoch nur dann Aussicht auf eine erfolgreiche Anwendung, wenn dabei der Eingriff nicht wesentlich verlängert wird, die Bedienung weitgehend automatisierbar ist und nicht zuletzt der finanzielle Aufwand den Einsatz dieses Verfahrens rechtfertigt. Ein solches Verfahren könnte eine optische Messung des Knorpels während der Arthroskopie sein.

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines solchen optischen Verfahrens auf Basis der nahen Infrarot-Spektroskopie und des dazu gehörigen Messsystems für die Bewertung von Knorpelschäden. Dazu soll die grundsätzliche Eignung dieser Technologie demonstriert, ein für den medizinischen Anwendungsfall geeignetes Messsystem vorgestellt und die Aussagekraft der damit gewonnenen Messwerte im Tiermodell untersucht werden.



## 2. PROPÄDEUTIK

### 2.1 NIR-Spektroskopie

Der Begriff Spektrum leitet sich aus dem Lateinischen von *spectrum* für ‚Erscheinung‘ bzw. von *specere* für ‚sehen, schauen‘ ab [14]. Spektrum ist ein fester Begriff sowohl in der Physik als auch in der Bildersprache und in der Mathematik. Physikalisch versteht man unter einem Spektrum die Darstellung einer Eigenschaft eines Signals (z. B. die Intensität einer Strahlung) über einer anderen (z. B. der Wellenlänge). Bei elektromagnetischer Strahlung wird meist die Intensität über der Strahlungsenergie aufgetragen. Ursprünglich wurde der Begriff Spektrum für das Lichtband gebraucht, das entsteht, wenn man einen beleuchteten Spalt auf einem Schirm abbildet oder eine dispersive Vorrichtung so in den Strahlengang bringt, dass das Licht entsprechend seiner verschiedenen Wellenlängen verschieden stark abgelenkt wird. Durch die Entwicklung neuer Farbstoffe und Detektoren wurde der Anwendungsbereich des Begriffs vom visuellen Bereich (VIS) auf den ultravioletten (UV) und infraroten (IR) Bereich des Lichts ausgedehnt. Spektrum wird heute für fast den gesamten Bereich der elektromagnetischen Strahlung gebraucht, aber auch Phänomene mechanischen, elektrischen, magnetischen oder chemischen Ursprungs werden damit beschrieben. Dementsprechend werden die weitgehend synonym gebrauchten Begriffe Spektroskopie bzw. Spektrometrie nicht mehr ausschließlich für Untersuchungen in der visuellen Optik gebraucht. Vielmehr wird Spektroskopie als ein Sammelbegriff für eine Klasse experimenteller Verfahren gebraucht, die untersuchen, wie eine Probe Energie aufnehmen oder abgeben kann. Analog werden in der Optik Messgeräte für die Spektroskopie meist Spektrometer genannt, sind aber auch als Spektroskope, Spektralphoto-

tometer oder Spektralradiometer bekannt.

Die wesentlichen signalgebenden Effekte bei der Absorptions- und Reflexionsspektroskopie (vgl. 2.1.1) sind Absorption und Streuung. Absorption steht dabei für den Übergang von Strahlungsenergie in andere Energieformen (meist Wärme). Streuung bedeutet die Richtungsänderung der Strahlung ohne Energieverlust. Hier soll Streuung als Sammelbegriff für mehrere physikalische Phänomene wie Brechung, Beugung, Reflexion usw. verstanden werden [91]. Unter Lumineszenz versteht man optische Strahlung, die beim Übergang von Atomen bzw. Molekülen aus einem angeregten Zustand zum Grundzustand unter zusätzlicher Abgabe von Wärme entsteht. Tritt dieser Übergang sehr kurz nach Anregung ein (meist innerhalb einer millionstel Sekunde), bezeichnet man den Effekt mit dem Begriff der Fluoreszenz, bei der Phosphoreszenz kann dies bis zu mehreren Stunden dauern. Alle Effekte sind stochastische Prozesse, wobei Art und Größe der Interaktion im Wesentlichen von der Zusammensetzung, der Form und der Größe der Medien sowie der Größe und Verteilung der Energie (Spektrum) der Anregungsstrahlung abhängen. Die Gesamtheit der für die Reflexionsspektroskopie wesentlichen Prozesse lässt sich in einer Energiebilanz der Form von Gl. 2.1 zusammenfassen, wobei  $I_0(\lambda)$  für die Intensität des eingestrahlteten Lichts der Wellenlänge  $\lambda$  steht,  $I_T$  für den Anteil der Transmission,  $I_A$  für den Anteil der Absorption und  $I_S(\lambda, \varphi)$  für die wellenlängen- und richtungsabhängige Streuung.

$$I_0(\lambda) = I_T(\lambda) + I_A(\lambda) + I_S(\lambda, \varphi) \quad (2.1)$$

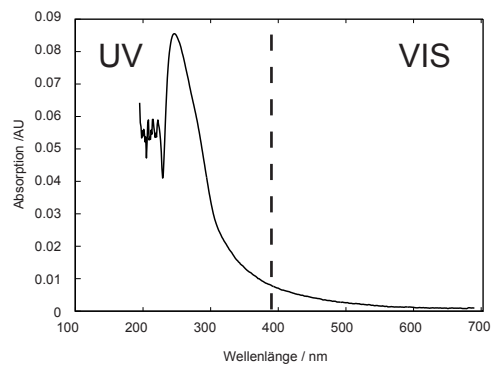
Ein Teilgebiet der optischen Spektroskopie ist die IR-Spektroskopie, die zur quantitativen Bestimmung von bekannten Substanzen, deren Identifikation anhand eines Referenzspektrums oder zur Strukturaufklärung unbekannter Substanzen genutzt wird [91]. Infrarotstrahlung liegt energetisch im Bereich der Schwingungsniveaus von Molekülbindungen, d. h. die Absorption führt zu einer Schwingungsanregung der Bindungen, weshalb sie auch oft als Schwingungsspektroskopie bezeichnet wird.

Der Infrarotbereich wird wegen unterschiedlicher physikalischer Effekte, aber auch aufgrund der vorhandenen Detektoren in Unterbereiche geteilt: das nahe Infrarot (NIR), das mittlere Infrarot (MIR) und das ferne Infrarot (FIR) (vgl. Tab. 2.1). Als Einheit für die Energie der elektromagnetischen Strahlung wird in der Physik überwiegend die Wellenlänge  $\lambda$  in nm oder  $\mu\text{m}$  verwendet, in der Spektroskopie findet man auch häufig ihren Kehrwert, die Wellenzahl  $\sigma = 1/\lambda$  [24] [42], meist in  $\text{cm}^{-1}$ . Im FIR absorbieren überwiegend die Molekülrotationen, im MIR die Molekülbindungen und im NIR zeigen sich die Obertöne und Kombinationsschwingungen der Molekülbindungen, insbesondere der  $CH-$ ,  $OH-$ ,  $NH-$  Bindungen (vgl. Abb. 2.2) [91]. Rotation und Bindungsverhalten sind vor allem bei großen Molekülen sehr spezifische Merkmale, so dass im FIR Untersuchungen zur räumlichen (sekundären und tertiären) Struktur möglich sind oder, im MIR, sehr genau die molekulare Zusammensetzung von Proben messbar ist [73]. Letzteres wird hauptsächlich in der so genannten Fingerprintregion (ca. 7.000 nm - 20.000 nm) durchgeführt, in der vor allem organische Verbindungen charakteristische Bandenstrukturen zeigen (vgl. Abb. 2.1(c)). Die Hauptnachteile dieser Verfahren liegen in der meist aufwändigen Probenvorbereitung, der starken Absorption von Wasser und Glas in diesem Wellenlängenbereich, der Notwendigkeit von starren Optiken und den relativ teuren Spektrometern.

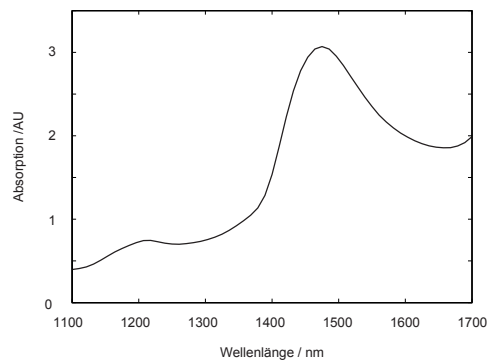
**Tab. 2.1:** Unterteilung des infraroten Spektralbereiches nach DIN 5031-7 (IR-A, -B, -C) und der internationalen Beleuchtungskommission CIE (NIR, MIR, FIR)

	Bezeichnung		Untergrenze $\lambda / \mu\text{m}$	Obergrenze $\lambda / \mu\text{m}$
IR	Nahes Infrarot (NIR)	IR-A	0,78	1,4
		IR-B	1,4	3
	Mittleres Infrarot (MIR)	IR-C	3	15
	Fernes Infrarot (FIR)		15	1000

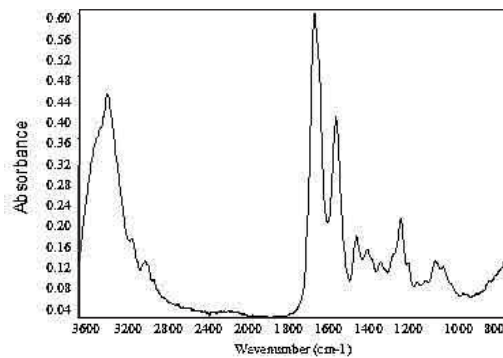
Spektren im NIR zeigen keine scharfen Peaks, die Intensitätsextrema erstrecken sich hier über ganze Wellenlängenbereiche (Banden) von bis zu über 100 nm Breite (vgl. Abb. 2.1(b)). Eine direkte Interpretation der Spektren, wie es im MIR und FIR möglich ist, kann hier nur selten und nur bei einfachen



(a) UV-VIS



(b) NIR



(c) MIR [85]

**Abb. 2.1:** Absorptionsspektren von Gelenknorpel über drei Wellenlängenbereiche: (a) UV-VIS-Absorption mit starker Absorption im UV und, entsprechend der bläulich weißen Farbe von Gelenknorpel, niedriger Absorption in VIS; (b) NIR-Absorption mit zwei Banden mit Maxima bei 1.240 nm (2. Obertöne der *CH*-Gruppen) und bei 1.480 nm (Überlagerung der 1. Obertöne der *OH*-, *CH*- und *NH*-Gruppen, vgl. Abb. 2.2; (c) MIR-FTIR-Spektrum der extrazellulären Knorpelmatrix mit Fingerprintbereich (ca. 1.500 cm<sup>-1</sup> – ca. 500 cm<sup>-1</sup>)

Gemischen erfolgen, da sich die Banden der einzelnen Komponenten (Grundbestandteile eines Gemischs) im NIR stark überlagern und eine Rücktransformation auf die Grundspektren nur sehr schwer möglich ist. Aus diesem Grund wurde die NIR-Spektroskopie in der Anfangszeit als ungeeignet für die Analyse eingestuft. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass durch den Einsatz chemometrischer Verfahren den NIR-Spektren sinnvolle Informationen zuzuordnen sind [73] [91] [96]. Mittels dieser Verfahren können statistische (weiche) Modelle erzeugt werden, die robust qualitative als auch quantitative Aussagen über Gemische ermöglichen. Die Grenzen dieser Modelle zeigen sich, wenn unbekannte Komponenten oder Konzentrationen im Gemisch vorkommen sowie in der Genauigkeit der Vorhersage, die eine Messabweichung von 0,1 % nur im Idealfall erreicht [20]. Licht im NIR-Bereich hat in manchen Wellenlängenbereichen eine höhere Eindringtiefe in organische Substanzen als Licht im VIS, MIR oder FIR. Viele konventionelle Lichtquellen emittieren auch im NIR mit hoher Intensität. Proben lassen sich ohne große Vorbereitung in Transmission oder Reflexion messen, und der Einsatz von Glasoptiken wie Linsen, Gitter oder Lichtleitfasern ist möglich. So lässt sich auch erklären, dass die meisten Applikationen der NIR-Spektroskopie ihren Ursprung in der industriellen Anwendung und nicht in der Forschung haben.

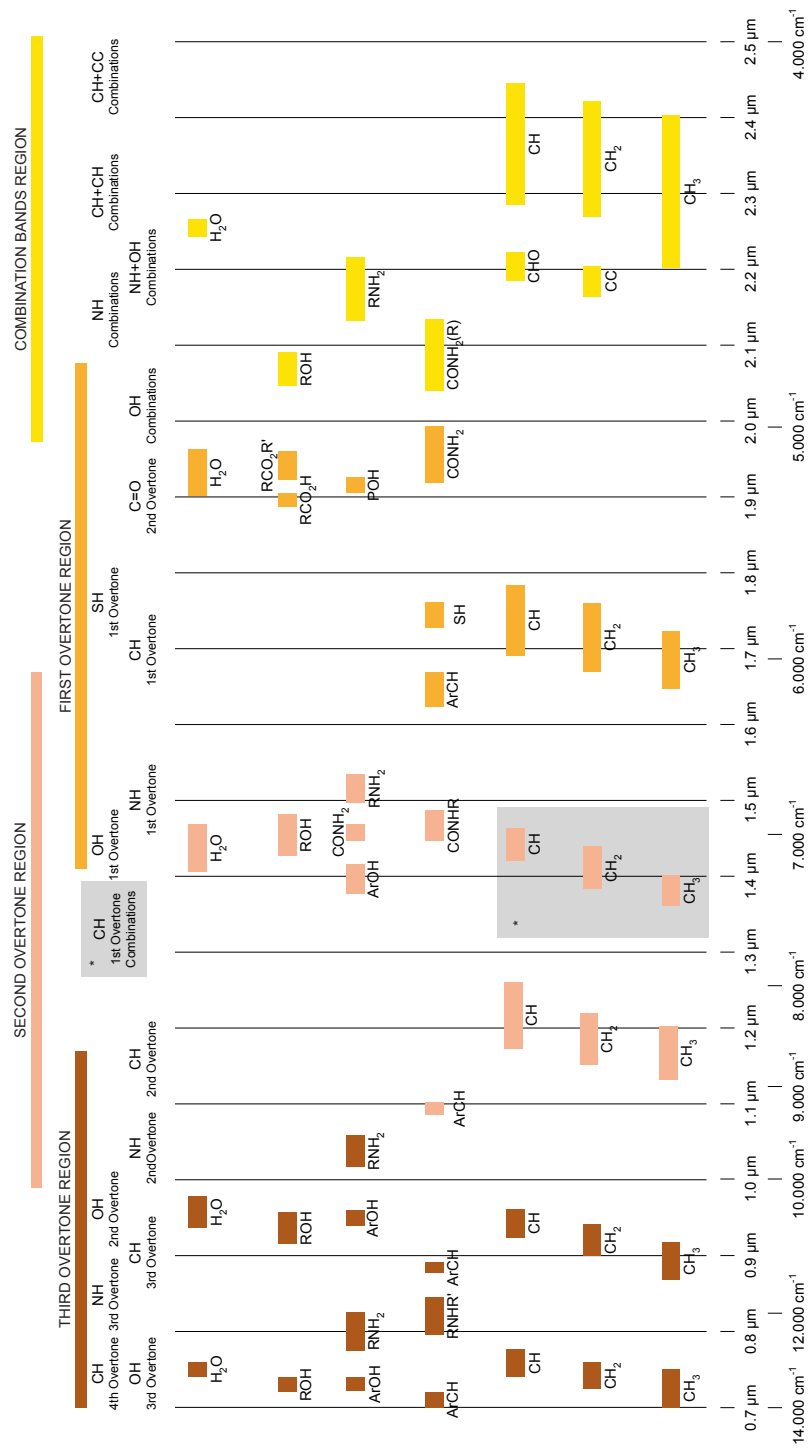


Abb. 2.2: Kombinationsbanden und Obertöne im NIR nach [45]

### 2.1.1 Methoden und Geräte in der NIR-Spektroskopie

Die gleichzeitige Erfassung der optischen Effekte Transmission, Streuung und Absorption bei der Interaktion von Licht mit Materie ist nur schwer möglich, weshalb man sich meist auf Einzelaspekte beschränkt. Entsprechend wird bei einer Transmissionsmessung der Anteil der eingestrahlten Energie bestimmt, der eine Probe unbeeinflusst passiert hat, bei Reflexionsmessungen der Anteil, der in eine bestimmte Richtung zurück gestrahlt wurde. Werden die Intensitäten für einzelne Wellenlängen bestimmt, ergeben sich Transmissions- bzw. Reflexionsspektren, aus denen sich mit Hilfe einer Referenz Absorptionsspektren (z. B. nach Gl. 2.2) mit der dimensionslosen Einheit  $AU$  (absorption [23] oder absorbance units) berechnen lassen<sup>1</sup>. Die Wahl der Anordnung von Lichtquelle und Detektor folgt dabei meist den Probeneigenschaften wie der optischen Dichte, den möglichen Weglängen oder der Oberflächenstruktur.

$$Absorption[AU] = -\lg\left(\frac{Reflexionsspektrum - Dunkelspektrum}{Referenzspektrum - Dunkelspektrum}\right) \quad (2.2)$$

Für die spektrometrische Messung sind grundsätzlich eine Lichtquelle, eine Vorrichtung zur Selektion spezifischer Wellenlängen und ein Detektor notwendig. Die Probe kann dabei vor oder nach dem Strahlenteiler angeordnet sein. Die Lichtquelle entfällt, wenn die Probe selbst strahlt.

Für die NIR-Spektroskopie werden als Lichtquellen hauptsächlich Halogen-Leuchtmittel eingesetzt, die sich durch einen relativ homogenen IR-Anteil im Spektrum auszeichnen. Leuchtdioden (LEDs) mit Emission im NIR sind verfügbar, decken allerdings noch nicht den gesamten Spektralbereich ab, so dass ihr Einsatz sich bisher auf Spezialanwendungen beschränkt, bei denen nicht der gesamte Spektralbereich benötigt wird. Multimode-Laser oder Streustrahlung von Teilchenbeschleunigern werden aufgrund ihrer schlechten Verfügbarkeit nur sehr begrenzt als Lichtquellen eingesetzt.

---

<sup>1</sup> Die Bezeichnung „Absorption“ in diesem Zusammenhang ist missverständlich, wird aber häufig benutzt (z. B. in [20]). Technisch korrekt wäre für Gl. 2.2 dekadische Extinktion bzw. negativer dekadischer Logarithmus des Durchlassgrades, der im englischen Sprachgebrauch mit „absorbance“ [63] bezeichnet wird. Des besseren Verständnisses wegen werden in dieser Arbeit dekadische Extinktionsspektren als Absorptionsspektren bezeichnet

Die zur Detektion eingesetzten Spektrometer werden häufig nach der Art klassifiziert, in der das Licht in Wellenlängenbereiche aufgeteilt wird. Filterpektrometer erfüllen diese Aufgabe entweder durch eine Anzahl von Bandpassfiltern (Glas- oder Interferenzfilter), meist auf einem Filterrads, oder durch variable Filter wie *Acousto-Optic-Tunable-Filters* (AOTF) [69] oder *Liquid-Crystal-Tunable-Filters* (LCTF) [61]. Während Filter Wellenlängenbereiche aus- bzw. einblenden, lenken dispersive Elemente Licht je nach Wellenlänge unterschiedlich ab und repräsentieren das Spektrum räumlich, wobei im NIR hierfür eher Beugungsgitter als Prismen eingesetzt werden. Wird das Gitter dabei bewegt, um die einzelnen Wellenlängen sukzessive auf einen Einzeldetektor zu lenken, oder wird der Detektor entlang des Beugungsspektrums bewegt, spricht man von scannenden Monochromatoren. Ohne bewegliche Teile kommen dagegen Diodenzeilenpektrometer aus. Hier werden CCD-Zeilen (Silicon, InGaAs oder PbS) so im Spektrum positioniert, dass der gewünschte Wellenlängenbereich auf die Zeile fällt. Durch die gleichzeitige Messung des gesamten Spektrums sind die Messzeiten dabei sehr kurz ( $\approx 1\text{ ms}$ ). Während bei Monochromatoren die Wellenlängenauflösung hauptsächlich durch die Präzision der Mechanik vorgegeben wird, ist bei Diodenzeilenpektrometern die Anzahl und Größe der messenden Pixel in der Zeile ausschlaggebend. Eine weitere Klasse bilden die Interferometer. Hier wird der Beleuchtungsstrahl aufgeteilt, über einen festen und einen beweglichen Spiegel abgelenkt und wieder zusammengeführt (Michelson-Interferometer). Durch die unterschiedlichen Weglängen entsteht ein Interferogramm, das mittels einer inversen Fourier-Transformation in die übliche Form eines Spektrums umgewandelt werden kann. Deshalb werden diese Geräte oft auch als FT-Spektrometer bezeichnet. Der hier die Auflösung bestimmende Faktor ist die Weglänge des Spiegels, der Wellenlängenbereich wird durch die Schrittweite bestimmt.

Da Quarzglas in weiten Bereichen des NIR (bis ca. 2.800 nm) transparent ist, können optische Bauelemente, wie sie aus dem VIS-Bereich bekannt sind (z. B. Hoch- oder Bandpassfilter, Spiegel, Linsen oder Gitter), in der NIR-Spektroskopie eingesetzt werden. Ebenfalls ist der Einsatz von Lichtleitfasern aus Quarzglas möglich, so dass eine flexible räumliche Trennung von Messort und Spektrometer möglich ist.



### 2.1.2 Datenverarbeitung

Die NIR-Spektroskopie fand erst größere Verbreitung, als es durch chemometrische Methoden [12] und moderne Rechentechnik möglich wurde, den der direkten Bewertung unzugänglichen Spektren sinnvolle Werte zuzuordnen. Mathematisch stellt sich eine spektroskopische Messung als ein überbestimmtes System dar, bei dem aus einer großen Anzahl von Messwerten (je nach Wellenlängenauflösung und Wellenlängenbereich bis zu mehreren zehntausend) wenige Eigenschaften der Probe bestimmt werden sollen. Diese Überbestimmtheit impliziert, dass in den Spektren neben dem eigentlichen Signal auch Teile an Redundanz und Rauschen enthalten ist. Deshalb wird in der Auswertung von NIR-Spektren oft die Anzahl der Messwerte reduziert (Regression), mit dem Ziel, Signal von Rauschen und Redundanz zu trennen und den Rechenaufwand zu reduzieren. Eine weitere Reduktion des Rauschanteils lässt sich durch Vorverarbeitung der Spektren erreichen. Mit der Kalibrierung (Erstellung einer Kalibration) wird nach möglichst robusten Zuordnungen zwischen Spektren und Eigenschaften der Probe gesucht. Die Kalibrationen, einschließlich Datenvorverarbeitung und Regression, werden durch Validierungsschritte überprüft, um die Qualität, also Genauigkeit und Robustheit der späteren Messung, zu charakterisieren.

#### Datenvorverarbeitung

Wie bei jeder Messung wird auch in der Spektroskopie das eigentliche Signal von Rauschen überlagert. Diese Störgröße wird durch nicht beobachtete oder nicht beobachtbare Einflüsse auf Probe und Messsystem verursacht. Gründe dafür können z. B. thermischen, mechanischen oder elektrischen Ursprungs sein oder in der Bedienung des Messgeräts liegen. Durch das Minimieren von Störeinflüssen, Referenzierung oder Mittelung von Wiederholungsmessungen kann Rauschen vermindert, aber nie ganz unterdrückt werden.

Das in den Messdaten verbleibende Rauschen kann durch mathematische Algorithmen weiter minimiert werden. Gegen im Vergleich zum Signal hochfrequente Störungen werden meist digitale Filter (z. B. Savitzky-Golay-Filter,

Gauss-Filter, Polynom- oder Spline-Approximationen) eingesetzt. Variationen in der Probendarbietung und Veränderungen im Messsystem haben oft eine Verschiebung der Spektren entlang der Ordinate (*baseline shift* oder *offset*) zur Folge. Die Korrektur dieses Offsets wird meist durch Subtraktion des Minimalwertes oder durch Ableitung (mit oder ohne anschließender Integration) erreicht. Bei einer wellenlängenabhängigen Verschiebung erscheint das Spektrum rotiert, was durch Subtraktion einer Geraden rückgängig gemacht werden kann. Verändert sich zwischen den Spektren der Verstärkungsfaktor (z. B. durch eine Drift im Detektor), kann es hilfreich sein, die Spektren zu normieren (z. B. durch Min-Max-Normierung, Vektornormierung oder Normierung auf eine Fläche). Die Verkürzung des Gesamtspektrums auf Teilbereiche oder die Anpassung der Wellenlängenauflösung in bestimmten Bereichen kann zu einem stärkeren Signal führen. Die Anwendung komplexerer Methoden zur Datenoptimierung (z. B. Wavelet-Filter) hat sich bisher in der NIR-Spektroskopie nicht durchgesetzt. [12] [20] [67]

## Kalibration

Ziel der Kalibration (auch Modellierung, meist als Regressions- oder Kausalanalyse) ist es, einen Zusammenhang zwischen den abhängigen, nicht beobachtbaren Variablen  $y$  (z. B. Wasser- und Fettgehalt) einer Probe, und den unabhängigen, beobachtbaren Variablen  $x$  (z. B. den Absorptionswerten eines Spektrums) herzustellen. Der Kalibration muss kein physikalisches Verständnis des Zusammenhangs zwischen  $x$  und  $y$  zugrunde liegen (so genannte „harte Modelle“), sie kann auch geraten, geschätzt oder numerisch ermittelt werden („weiche Modelle“). Die dabei häufig vorgenommene Reduktion der unabhängigen Variablen (Regression) kann den eigentlichen Kalibrationsschritten voran gehen, ist jedoch meist integraler Bestandteil der Modellierung. Eine allgemeine Form der Kalibration kann gemäß Gleichung 2.3 dargestellt werden, wobei  $b$  meist Regressions- oder Kalibrationsfunktion oder kurz Kalibration genannt wird und  $\epsilon$  den verbleibenden Fehler (auch Störgröße) darstellt.

$$y = xb + \epsilon \quad (2.3)$$

Erfolgt die Verknüpfung von abhängigen und unabhängigen Variablen über lineare Gleichungen der Form

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_n x_n + \epsilon, \quad (2.4)$$

spricht man von multipler linearer Regression (auch multilineare Regression, MLR) [12]. Eine Kalibration mit nur einem linearen Glied ( $y = \beta_0 + \beta_1 x$ ) nennt man SLR (*simple linear regression*).

Verstärkt werden in der NIR-Spektroskopie statistische Verfahren wie die *nonlinear-iterative-least-squares* Methoden eingesetzt, die vor allem von Herman World [114] entwickelt wurden. Bekannte Vertreter dieser Methoden sind die Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*, PCA), die *partial least square* (PLS) Pfadanalyse und die Faktorenanalyse. In den letzten Jahren werden auch verstärkt Verfahren der künstlichen Intelligenz wie künstliche neuronale Netzwerke (ANN) [34] oder die Fuzzy-Logik zur Modellbildung untersucht [12].

Das in der NIR-Spektroskopie am häufigsten zur Schätzung der Kalibrationsfunktion eingesetzte Verfahren ist die PLS [20]. Dabei wird versucht, die abhängigen Variablen mit Hilfe einer *Least-Square*-Schätzung möglichst genau zu prognostizieren [12]. Die Dominanz der PLS in der NIR-Spektroskopie liegt nicht an der Überlegenheit dieses Verfahrens bezüglich der Qualität der Kalibration gegenüber anderen Methoden, sondern an der einfachen Handhabung und Implementierbarkeit in Anwenderprogrammen und am erheblich geringeren Rechenaufwand im Vergleich zur MLR oder zu ANN [20].

Welches Verfahren bei einer gegebenen Messaufgabe mit der zur Verfügung stehenden Messhardware letztendlich zu der besten Kalibrierfunktion führt, kann in der Regel nur über die Ergebnisse der Validierung ermittelt werden [20].

Zur Bestimmung und Optimierung einer Kalibrationsfunktion muss ein voll-

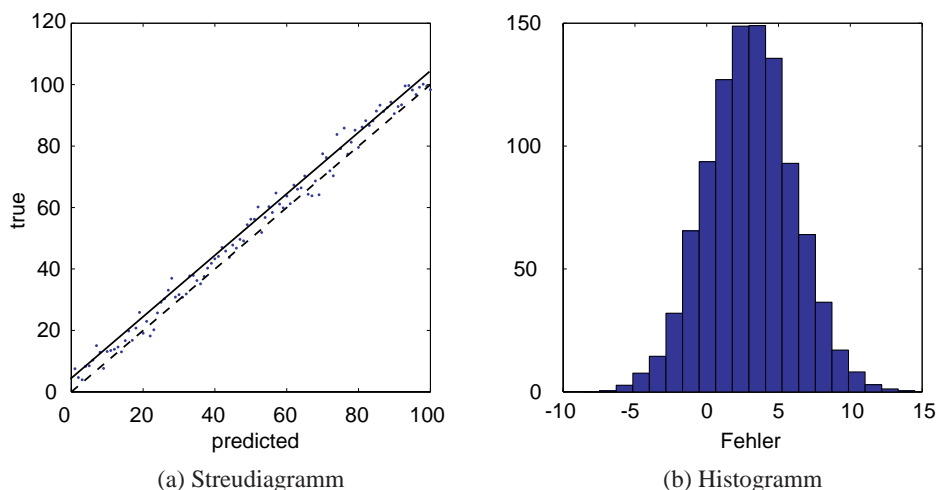
ständiger Datensatz mit bekannten abhängigen und unabhängigen Variablen vorliegen – das Trainings- oder Kalibrationsset. Die dazu verwendeten Proben sollten eine möglichst repräsentative Teilmenge der zu erwartenden Probenpopulation darstellen, was sowohl die Konzentrationen der gesuchten Eigenschaften als auch andere Einflussfaktoren wie Temperatur, Herkunft oder Probengeschichte betrifft [21]. Die Robustheit der Kalibration steigt mit der Probenzahl und der im Trainingsset beinhalteten Variationen der Proben. Eigenschaften außerhalb des Wertebereichs des Trainingssets (Extrapolation) werden meist schlechter vorhergesagt. Die Werte der abhängigen Variablen werden durch so genannte Referenzmethoden, also alternative Messverfahren, bestimmt. Die Genauigkeit dieser Referenzmethoden ist ein limitierender Faktor der Qualität der Kalibration. [12], [20]

## Validierung

Als Validierung bezeichnet man die Überprüfung der Qualität von Kalibrationen in Bezug auf Messgenauigkeit und Robustheit. Idealerweise stehen dazu Proben bekannter Eigenschaften zur Verfügung, die nicht zur Kalibrationserstellung verwendet wurden. Die Eigenschaften dieser Proben werden durch die Kalibration vorhergesagt und anschließend mit den Referenzwerten verglichen. Dieses Vorgehen wird externe oder Testset-Validierung genannt. Die Abweichung der vorhergesagten Werte  $y_p$  (*predicted*) von den Referenzwerten  $y_t$  (*true*) wird oft als Fehler bezeichnet, obwohl die Referenzverfahren selbst fehlerbehaftet sind. Für die Beurteilung der Qualität einer Kalibration bestehen keine eindeutigen Vorschriften, vielmehr bedient man sich grafischer Darstellungen und Kenngrößen, die aus der Gesamtheit der Fehler ermittelt werden. [12]

Eine bekannte Darstellungsweise ist das Streudiagramm, in dem die vorhergesagten Werte  $y_p$  gegen die Referenzwerte  $y_t$  als Punktwolke aufgetragen werden (vgl. Abb. 2.3, (a)). Abweichungen der Datenpaare von der Winkelhalbierenden verdeutlichen Betrag und Lage der Fehler. Die Verteilung der Fehler in einem Histogramm (vgl. Abb. 2.3, (b)) verdeutlichen Offsets vom Nullpunkt oder die Häufigkeit und den Betrag von Ausreißern.

Aus der Gesamtheit der Messwerte des Testsets lassen sich Kenngrößen zur



**Abb. 2.3:** Streudiagramm (a) und Histogramm (b) einer simulierten linearen Funktion  $y = (x + \Delta)\epsilon$  mit positivem Offset ( $\Delta$ ) und normalverteilter Streuung ( $\epsilon$ )

Bewertung einer Kalibration ableiten. Ein Maß für den linearen Zusammenhang zwischen Mess- und Referenzwert liefert der Korrelationskoeffizient  $r$  (z. B. nach Bravais-Pearson) oder sein Quadrat  $r^2$ , wobei Werte nahe  $\pm 1$  auf deutliche, nahe 0 auf keine Linearität hinweisen. Problematisch ist  $r$ , da mit diesem Maß z. B. Offsets und Steigung in den Daten nicht bewertet werden und eine Clusterbildung hohe Werte für  $r$  zur Folge hat. Weitere Kenngrößen sind Mittelwert und Standardabweichung der absoluten ( $y_p - y_t$ ) oder relativen ( $(y_p - y_t)/y_t$ ) Fehler. In der Spektroskopie ist neben der zweifachen Standardabweichung als Fehlerbeschreibung die Angabe der Quadratwurzel der Summe aller Fehlerquadrate (*root mean square error*, RMS oder RMSE) zur Bewertung von Kalibrationen üblich.

Stehen nicht genügend Proben für die Kalibrationsentwicklung und eine externe Validierung zur Verfügung, wird das Verfahren der internen bzw. Kreuzvalidierung angewendet. Dabei werden eine oder mehrere Proben aus dem Trainingsset entfernt, aus den übrigen die Kalibration bestimmt und mit dieser Kalibration die Eigenschaften der entnommenen Proben vorhergesagt und mit den Referenzwerten verglichen. Danach werden die entnommenen Proben dem Trainingsset wieder zugefügt und das Verfahren so lange wiederholt,

bis alle Proben entnommen wurden. Die Güte der Kalibration kann analog zur externen Validierung beschrieben werden, wobei man zur Unterscheidung der Verfahren den RMS der internen Validierung oft als RMSECV (CV für *cross validation*) bezeichnet im Gegensatz zu RMSEP (P für *prediction*) bei der externen Validierung.

### 2.1.3 Anwendungsfelder

Mittlerweile ist die NIR-Spektroskopie ein fester Bestandteil im messtechnischen Repertoire vieler Forschungs- und Anwendungsgebiete. Aufgrund der Vielzahl der Applikationen können die nachfolgenden Beispiele nur einen Eindruck vermitteln.

Der Erfolg dieser Technik ist eng verbunden mit den grundlegenden Arbeiten von Norris und Hart [72], die sie als Methode zur Eiweiß- und Feuchtebestimmung von Getreide im Agrarbereich etablierten. Damals noch Labormethode, wird mittlerweile Getreide mittels NIR online auf Erntemaschinen oder in Großanlagen analysiert oder mittels tragbarer Geräte vor Ort auf seine Qualität geprüft [107].

In der Biotechnologie wird NIR-Spektroskopie zur Überwachung mehrerer Prozessparameter, wie z. B. der Zellzahl oder des Glucosegehaltes, eingesetzt [58], [55], wobei oft Fasersonden für eine direkte Messung im Medium eingesetzt werden [89]. In den Geowissenschaften wurde diese Technik z. B. von Fischer und Pieters zur Bestimmung des Eisenanteils von Mondgestein verwendet [33]. In der Umwelttechnologie konnte die Brauchbarkeit der NIR-Spektroskopie für die Überwachung von organischen Abfallstoffen nachgewiesen werden [29]. In der Pharmaindustrie wird die Produktqualität durch NIR-Spektroskopie zerstörungsfrei überwacht [56], etwa bei der Produktion von Resorcin in wässriger Lösung [116] oder der Beurteilung des Mischungsgrades von Wirkstoff und Trägerstoff [109]. In der Lebensmittelindustrie sind schon seit über 20 Jahren Geräte zur Analyse von Fleisch- und Wurstwaren auf dem Markt, aber auch die Überwachung von Hefe und Alkohol in Bier [73] oder Wein [73] sowie die Ursprungsbestimmung von Olivenöl [35] sind bekannte Applikationen. Eine neuere Studie zeigt, dass auch die chemischen

Änderungen im Molkebruch bei der Produktion von Cheddarkäse verfolgt werden können [53]. Isaksson et al. beschreiben ein Verfahren zur zerstörungsfreien Bestimmung der Kramerschen Scherkraft [94] von Lachsfilets aus VIS/NIR-Spektren [43]. In der Rüstungsindustrie werden damit z. B. Treibgas oder Sprengstoff analysiert [88].

In der Medizin ist die NIR-Spektroskopie hauptsächlich Gegenstand der Forschung, klinische Anwendungen sind noch selten. Weit verbreitet ist die Messung der Absorption in VIS/NIR (bei 660 nm und 910 nm oder 940 nm) zur Bestimmung des Blutsauerstoffgehalts (Puls-Oxymeter) [76]. Neuere Anwendungen zeigen die Möglichkeiten der NIR-Spektroskopie bei der Messung des Blutsauerstoffs in Muskeln [11] oder der cerebralen Oxygenierung bzw. Hämodynamik [76]. Der optimistischste Ansatz zur Anwendung von NIR-Spektroskopie in der Medizin dürfte der Versuch gewesen sein, eine unblutige Messung des Blutzuckerspiegels von Diabetikern zu realisieren. Nach anfänglicher Euphorie zeigte sich jedoch, dass interindividuelle Unterschiede, thermische Effekte und unterschiedliche Anatomie eine einfache Umsetzung unmöglich machen. Neuere Arbeiten mit verbesserter Technik und optimierter Auswertung (z. B. [59], [62]) deuten jedoch an, dass dieses Ziel doch noch erreicht werden könnte. Eine Quantifizierung von Protein-, Keratin- und Harnstoffgehalt im Urin konnten Shaw et al. mittels NIR-Spektroskopie vornehmen [97]. Schulz et al. konnten zeigen, dass sich die Oxygenierung von Lebergewebe bei Kindern mittels NIR bestimmen lässt, und verglichen die Befunde mit dem Sauerstoffgehalt venösen Blutes [93]. Rendell et al. demonstrierten, dass sowohl Blutflussgeschwindigkeit als auch der Hämoglobingehalt dieser Methode zugänglich sind [87]. Vorstudien zeigen, dass die NIR-Spektroskopie bei der Züchtung von Knorpelzellen zur nicht invasiven Überwachung der Kultur eingesetzt werden kann [55]. Bei der Untersuchung von Arthereoskleroseherden zeigten Moreno et al., dass sich die Zusammensetzung des Plaques in Gefäßen über Faseroptiken messen lässt [66]. Shaw et al. zeigten, dass sich über VIS-NIR-Spektren von Synovialflüssigkeit auf das Vorhandensein von Arthrose schließen lässt [96].

## 2.2 Arthrose

Arthrose, auch Gelenkverschleiß oder Arthrosis deformans (engl. *osteoarthritis*, OA), ist eine degenerative Gelenkerkrankung [39], die primär durch den Abbau des Gelenkknorpels gekennzeichnet ist [38]. Am häufigsten sind von der Arthrose die großen Gelenke Hüfte, Knie und Schulter betroffen, wobei das Knie mit ca. 60 % Prävalenz das am häufigsten betroffene Gelenk ist, gefolgt von der Hüfte mit 38 % und der Schulter mit ca. 27 % [30]. Im Unterschied zeigt sich Arthritis, eine primär entzündliche Gelenkserkrankung, meist in den kleinen Gelenken der Finger und Zehen sowie in den Sprung- und Handgelenken. In ihrer latenten Form verursacht Arthrose zunächst nur in bestimmten Situationen Beschwerden wie Anlaufschmerzen und Gelenkknirschen. Sobald die Gelenkmembran Entzündungsmediatoren abgibt, zeigt sich eine aktivierte Arthrose mit Bewegungs- und Ruheschmerz sowie Ergussbildung oder Synoviitis (Entzündung der Gelenkinnenhaut). Im weiteren Verlauf entstehen wegen des Abbaus des Knorpels Verdichtungen im Bereich der gelenknahen (subchondralen) Knochen (Kalzifizierung) sowie pathologische Veränderungen der Gelenkschleimhaut und der Gelenkkapsel, der Muskulatur, der Gelenkstellung und des Bewegungsmusters des Patienten [90], [103]. Arthrose ist eine der häufigsten Ursachen für eingeschränkte Bewegungsfähigkeit. Von ihr sind ca. 10 % der Bevölkerung über 50 Jahre betroffen und jedes Jahr entwickeln 2 % der weiblichen und 1,4 % der männlichen Bevölkerung arthrothische Symptome (jeweils Prävalenz) [79]. Die daraus resultierenden Behandlungskosten, Arbeitsausfall und Folgekosten erreichten in den USA 1995 eine Größenordnung von 2 % des Bruttoinlandprodukts [86].

### 2.2.1 Gelenkknorpel

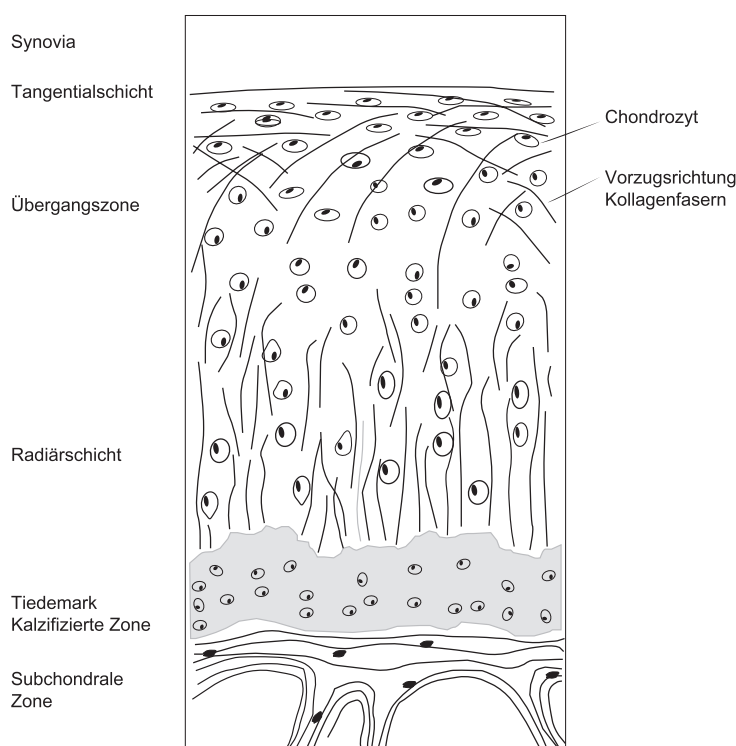
Hyaliner Knorpel (*Hyalos* griechisch für ‚Glas‘) ist ein hochspezialisiertes Gewebe, das die Oberflächen von Knochen in Gelenken bildet, aber auch beispielsweise in den großen Atemwegen vorkommt. Er ermöglicht nahezu reibungsfreies Gleiten. Seine hydrodynamischen Eigenschaften ermöglichen



die Absorption und Verteilung stoßförmiger Belastungen. Er besitzt keine Nerven, Lymph- oder Blutgefäße. Die Knorpelzellen werden indirekt über die Gelenksflüssigkeit, die Synovia, versorgt. Makroskopisch hat er eine milchglasartige, bläulich-weiße Erscheinung (vgl. 2.1(a)). Gelenkknorpel ist die am häufigsten vorkommende Art Knorpel und unterscheidet sich von den anderen im Körper vorkommenden Knorpeltypen (elastischer und Faserknorpel) durch die Zusammensetzung seiner Matrix bzw. deren Grundkomponenten. Die Matrix setzt sich aus Knorpelzellen (Chondrozyten) und extrazellulärer Matrix zusammen. Die Knorpelzellen entwickeln sich aus mesenchymalen Stammzellen und sind verantwortlich für den Abbau und die Neubildung der extrazellulären Matrix. In gesundem Knorpel nehmen sie ca. 5 % des Nassgewichts ein [79]. Wasser, der Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix, stellt bei gesundem Knorpel etwa 75 % der Gesamtmasse [46]. Der Großteil des Wassers wird durch negativ geladene Glykosaminoglykane (GAGs) gehalten, Polysaccharidketten, die über einen Eiweißkern (Hyaluronsäure) die Protoglykane bilden (ca. 20 % bis 25 % der Trockenmasse) [95]. Über elektrostatische Effekte verbinden sich diese amorphen Makromoleküle mit Kollagenfasern (*cross-link*) und bilden so die Matrix. Im Gelenkknorpel wird hauptsächlich Kollagen vom Typ II gefunden, das, wie alle Kollagene, die Struktur einer Dreifachhelix aufweist. Die Kollagenfasern (ca. 75 % des Trockengewichts) sind für die Druck- und Scherbeständigkeit des Knorpels verantwortlich. Daneben lassen sich zahlreiche andere Moleküle, wie z. B. Typ IV- und Typ IX-Kollagene, Biglykan oder Decorin nachweisen, die zu den spezialisierten Eigenschaften des Knorpels beitragen [95]. Durch die negative Ladung der Protoglykane wird eine große Anzahl an Anionen gebunden, weshalb ein osmotischer Druck im Verhältnis zu der den Knorpel umgebenden Flüssigkeit entsteht. So schwillt der Knorpel in Grenzen an, wenn er nicht durch Druck belastet wird.

Histologisch lässt sich Knorpel in vier Zonen bzw. Schichten einteilen (vgl. Abb. 2.4). In der dünnen Tangentialschicht (engl. auch *superficial zone*) befinden sich dicht gepackte Kollagenfasern parallel zur Oberfläche. In der darunter liegenden Übergangsschicht (*transitional zone*) verändert sich die Orientierung der Kollagenfasern, bis sie in der Radiärschicht senkrecht zur

Knorpel- bzw. Knochenoberfläche verlaufen. Die darunter liegende Schicht, die kalzifizierte Zone oder das Tidemark, verankert die Kollagenfasern mit dem Knochen. Die genauen Funktionen der einzelnen Zonen sind noch nicht geklärt, es ist jedoch bekannt, dass der Wassergehalt in der Tangentialschicht mit 82 % etwas höher ist als in der Radiärschicht mit 76 %. Die Tangentialschicht ist wasserundurchlässig und enthält einen geringeren Anteil an Pro-toglykanen als die anderen Schichten.



**Abb. 2.4:** Vereinfachte Darstellung des Aufbaus von Gelenkknorpel nach [95]

Der Aufbau und die biochemische Zusammensetzung von hyalinem Knorpel sind in Säugetieren weitgehend identisch, die Unterschiede bewegen sich in Konzentrationsbereichen, die mittels NIR-Spektroskopie nicht nachweisbar sind. Unterschiede in der Lage der Belastungszonen aufgrund der unterschiedlichen Anatomie, ebenso wie in der Knorpeldicke müssen beim Vergleich unterschiedlicher Tiermodelle dagegen beachtet werden. Als etablierte Modelle für humanen Knorpel gelten das Hausschaf (*Ovis orientalis aries*),

das Pferd (*Equus ferus caballus*), das Hausschwein (*Sus scrofa domestica*) und die Maus (*Murinae*). [112], [105]

Gelenkknorpel zeigt bei mechanischer Belastung viskoelastisches Verhalten wie Verformung, Kriechen, Spannungsrelaxation und Energieumwandlung. Diese komplexen Antworten leiten sich aus den Fließeigenschaften durch die porös-permeable Matrix und den physikalischen Wechselwirkungen der Komponenten der Matrix ab. Als Reaktion auf Zugspannung schwenken sich die Kollagenfasern in Richtung der Spannung und werden gestreckt. Dabei ist die Zugsteifigkeit abhängig von der Dichte und Richtung der Kollagenfasern sowie deren Vernetzungsgrad. Die Zugsteifigkeit ist eine flussunabhängige Eigenschaft der festen Phase des Knorpels, wobei bei gesundem Knorpel Werte von 5 MPa bis 25 MPa, je nach Messstelle, gefunden wurden [48]. Unter Druck verformt sich der Knorpel, wodurch sich die Kontaktflächen vergrößern und die Belastung besser verteilt werden kann. Bleibt die Druckbelastung bestehen, kommt es zu Volumenänderungen und viskoelastischem Verhalten durch Umverteilung in der Matrix und durch den Austritt von Flüssigkeit aus der Knorpelmatrix. Dieser Prozess ist reversibel, auch wenn es, je nach Größe und Dauer der Belastung, mehrere Stunden dauern kann, bis der Knorpel seine unbelastete Form wieder annimmt. Die Druckfestigkeit (*compressive modulus*) variiert von 2 MPa bis 10 MPa kurz nach Belastungsbeginn und liegt bei ca. 0,6 MPa bei langfristiger Belastung. Auf Scherspannung reagiert Knorpel sowohl mit Verformung als auch mit Ausdehnung der Matrix. Bei reiner Scherbelastung bleibt das Volumen konstant, im Gleichgewicht weist Knorpel ein Schermodul von 0,1 MPa bis 0,4 MPa auf [106].

### 2.2.2 Krankheitsverlauf

Neben der Degradierung und schließlich dem Verlust des Knorpels zeigt sich bei Arthrose ein Umbau des subchondralen Knochens, die Bildung von Osteophyten und eine Entzündung der Gelenkkapsel.

Der Knorpel zeigt in der frühen Phase der Arthrose eine Störung der Homeostase, die durch eine Veränderung im Kollagen-Protoglykan-Netzwerk hervorgerufen wird. Das wird hauptsächlich durch eine Aktivierung von Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs) nach Stimulation durch Zytokine wie IL-1 und TNF $\alpha$  hervorgerufen [90]. Dies hat eine erhöhte Wasseraufnahme zur Folge, aus der eine Erweichung des Knorpels resultiert [1]. Ist dabei die Knorpeloberfläche noch unbeschädigt, spricht man von einem erstgradigen Knorpelschaden (vgl. Tab. 2.2). Im zweiten Stadium zeigen sich oberflächliche Schäden wie Risse und Spalten. Erreichen diese Schäden den Gelenkknochen, spricht man vom dritten Stadium, der Totalverlust des Gelenkknorpels kennzeichnet das letzte Stadium.

### 2.2.3 Diagnostik

#### Differentialdiagnostik

Meist berichtet der Patient bei der Anamnese über Gelenkschmerzen. Für die Differentialdiagnostik der Arthrose schlägt Burmester [18] die Beachtung folgender Punkte vor: die berufliche Exposition, die Freizeitaktivitäten und Sportarten, die Familienanamnese, insbesondere bei der Fingergelenkpolyarthrose, Stoffwechselerkrankungen, Besonderheiten in der Vorgeschichte, wie z. B. Hüftgelenkdysplasien als Kind, Operationen und Frakturen sowie einseitige Belastungen und Zwangshaltungen. Aber auch Übergewicht und Ernährungsgewohnheiten sollten in die Anamnese einbezogen werden. Rauchen und Alkohol scheinen keinen Einfluss auf Gelenkserkrankungen zu haben [2].

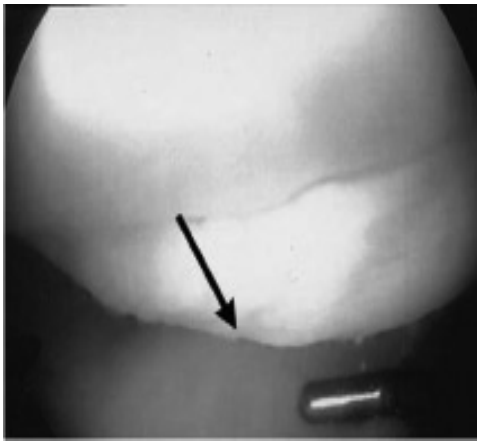
#### Bildgebende Verfahren

Zur bildlichen Darstellung eines Knorpelverlustes bei Arthrose dient als Standarduntersuchung immer noch die konventionelle Röntgenaufnahme, wobei die Größe des Gelenkspaltes, osteophytische Anbauten, der subchondrale

Sklerosierungsgrad sowie andere Veränderungen ausgewertet werden [92]. Präzise Ergebnisse konnten dabei im Kniegelenk nur im medialen, nicht aber im lateralen Kompartiment erzielt werden [17], [16]. Auch kann nicht zwischen femuralem oder tibialen Knorpelverlust unterschieden werden, und eine Lokalisation des Knorpelschadens ist sehr schwer möglich.

Eine wesentliche Verbesserung gegenüber der konventionellen Röntgenaufnahme ist die CT-Arthrographie, wobei zur Sichtbarmachung des Knorpelgewebes Röntgenkontrastmittel in den Gelenkspalt injiziert wird, wodurch sowohl die Knorpel-Knochengrenze als auch die Grenze zwischen Knorpel und Gelenkbinnenraum gut abgegrenzt wird. Dieses Verfahren ist jedoch invasiv, da die Gelenkpunktion mit einer Injektion von Kontrastmittel verbunden ist, und führt oft zu einer Schmerzbelastung des Patienten.

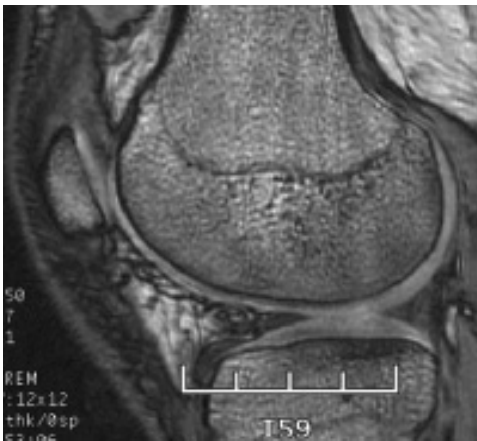
Eine andere Möglichkeit stellt die B-Mode-Sonographie dar, mit welcher allerdings nach Aisen et al. [4] sowie Jägemann und Jägemann [44] nicht alle Gelenkanteile verlässlich dargestellt werden können. Die Magnetresonanztomographie (MRT oder MIR) hat sich in den letzten Jahren als bildgebendes Verfahren im klinischen Alltag etabliert, unter anderem auch deshalb, weil mit dieser Methode Weichteilkontraste deutlicher darstellbar sind als durch andere Techniken. Dies ermöglicht unter anderem eine direkte Darstellung des Gelenkknorpels (vgl. Abb. 2.5). Durch die Wahl einer geeigneten Sequenz sowie die Beeinflussbarkeit anderer Aufnahmeparameter wie Repetitionszeit, Echozeit und Flipwinkel, kann die kontrastreiche Darstellung spezifischer Gewebe optimiert werden [92]. Untersuchungen von Eckstein et al. [27] zeigten, dass hochauflösende 3D-Gradientenechosequenzen in Hochfeldtomographen im Vergleich zu anderen MR-Techniken die akkurateste Beurteilung von Knorpelvolumen des Kniegelenks an Schnittbildern erlauben [28]. Zwar werden MRT-Untersuchungen häufig zur OP-Planung vor arthroskopischen Eingriffen durchgeführt, aber der Nachweis von primären Knorpelschäden ist mit den heute üblichen klinischen Magneten (Feldstärken von 0,5 T bis 2 T) und den verwendeten Knorpelsequenzen jedoch nicht möglich [101].



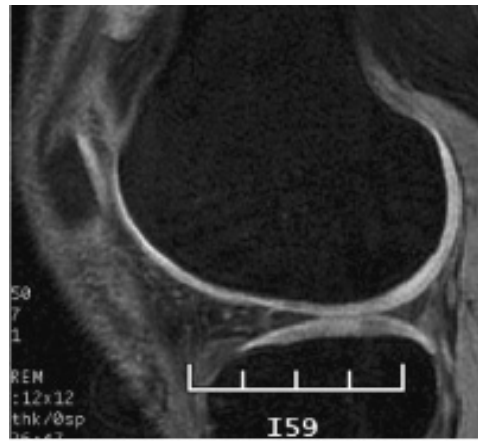
(a) Arthroskopische Aufnahme eines Knorpelschadens am lateralen Kondylus (Pfeil) und Tasthaken (unten rechts)



(b) Röntgenaufnahme des lateralen Kondylus mit Osteophyt (Pfeil)



(c) Sagittaler Schnitt durch ein Kniegelenk, aufgenommen mittels MRI (*spoiled gradient echo sequence*) ohne Fettunterdrückung



(d) Sagittaler Schnitt durch ein Kniegelenk, aufgenommen mittels MRI (*spoiled gradient echo sequence*) mit Fettunterdrückung

**Abb. 2.5:** Darstellung eines Knorpelschadens mit unterschiedlichen bildgebenden Verfahren [38]

### Arthroskopie

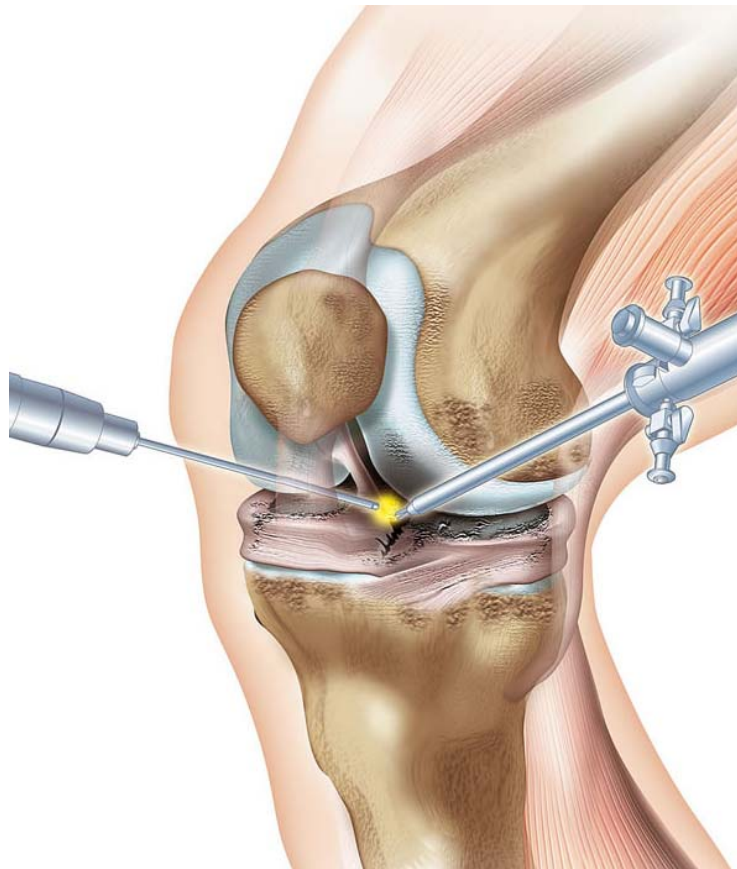
Die Arthroskopie, auch Gelenkspiegelung, ist ein minimal-invasiver Eingriff mit sowohl diagnostischer als auch therapeutischer Zielstellung. Dabei wird unter Lokal- oder Allgemeinanästhesie das Gelenk zuerst gespült und mit

einer klaren Flüssigkeit (Ringer-Lösung, Purisole-Lösung) gefüllt, bevor das Arthroskop in das Gelenk eingeführt wird. Das Arthroskop ist ein spezielles Endoskop, bestehend aus einem optischen System, einer Lichtquelle, häufig einer Spül- und Absaugvorrichtung und einem Videosystem zur Bilddarstellung und -archivierung. Über einen zweiten Arbeitszugang kann der Chirurg Instrumente in das Gelenk einbringen, um zusätzlich zur visuellen Darstellung das Gelenk zu untersuchen und bei entsprechender Indikation therapeutische Maßnahmen zu ergreifen (vergl. 2.6). Die häufigsten Behandlungen in der Arthroskopie sind Knorpelglättung bzw. Abtragung von defektem Knorpel, Meniskus(teil)resektionen, Kreuzbandplastiken und Kapsuloraphie (bei Rotatorenmanschettenläsionen).

Die Diagnose von Knorpelschäden wird während der Arthroskopie nach international festgelegten Standards (z. B. Tab. 2.2) durch optische Untersuchung und Palpieren mit einem chirurgischen Tasthaken durchgeführt.

### Biochemische und histologische Verfahren

Die pathologische Veränderung von Gelenkknorpel spiegelt sich auch in der biochemischen Zusammensetzung des Gewebes wider, die durch chemische Analysen von Explantaten (z. B. aus Biopsien) untersucht werden kann. Die Verteilung der Hauptbestandteile Wasser, Kollagen II und Protoglykan (über den Aggrecan- oder Glucosaminoglykangehalt) kann einen Hinweis auf den Schadensgrad geben, aber auch andere Biomarker wie Proteinkernfragmente, Keratinsulfat, Pyridinoline (+Urine), *Cartilage oligomeric matrix protein* (COMP) oder Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs) werden als Indikatoren für Gelenkserkrankungen untersucht [78]. Mendel et al. [64] zeigten, dass auch mittels Bio-Ferrografie Zielanalyte in der Synovia analysiert werden können. Da diese Untersuchungen stark invasiv sind und das untersuchte Gelenk dabei zerstört wird, sind sie für die Routinediagnostik ungeeignet. Eine Analyse der Gelenksflüssigkeit ist vergleichsweise wenig belastend, kann aber nur Aussagen über das Vorhandensein einer Arthrose liefern, nicht jedoch über die Lage.



**Abb. 2.6:** Skizze einer Arthroskopie mit Arthroskop (links) und Werkzeug (rechts) [37]

In der Histopathologie wird Arthrose üblicherweise nach dem histologisch histochemischen Gradierungssystem (HHGS, auch Mankin-Score, vgl. Tab. 2.2.3) nach Mankin [60] oder Variationen davon eingeteilt. Ursprünglich zur Einteilung von humaner Arthrose entwickelt, wird es nicht nur in vielen Studien in der Humanmedizin, sondern auch an verschiedenen Tiermodellen eingesetzt [74].

Neue optische Verfahren zeigen, dass sie eine Ergänzung der klassischen Verfahren darstellen können. So zeigten z.B. Potter et al. [85], dass sich durch bildgebende IR-Mikroskopie Kollagene und Proteoglykan ohne Färbetechniken in speziellen Mikroskopen darstellen lassen. Mit der gleichen Technologie konnten West et al. [111] das Fortschreiten künstlich induzierter Arthrose an



**Tab. 2.2:** Einteilung von Knorpelschäden in der Arthroskopie nach Outerbridge [13] und der *International Cartilage Repair Society* (ICRS) [75]

Outerbridge		ICRS	
<b>0</b>	Normalbefund, intakter Knorpel mit glatter weißer Oberfläche und guter Konsistenz	<b>0</b>	Normaler Gelenkknorpel
<b>I</b>	Erweichung der Oberfläche, aber glatt erhaltene Oberfläche ohne Fibrillation	<b>1</b>	Fast normaler Knorpel, oberflächliche Läsionen mit Erweichung und/oder oberflächlichen Fissuren und Rissen
<b>II</b>	Oberfläche aufgefasert mit Einrissen und deutlicher Fibrillation	<b>2</b>	Abnormaler Knorpel, Läsionstiefe <50 % der Knorpeldicke
<b>III</b>	Tiefe Fissuren, Ulcus bzw. Krater mit instabilen oder unterminierten Rändern, subchondraler Knochen noch nicht erreicht	<b>3</b>	Deutlich abnormaler Knorpel, Läsionstiefe >50 % der Knorpeldicke
<b>IV</b>	Vollschicht-Knorpelverlust bis auf den subchondralen Knochen	<b>4</b>	Vollständiger Knorpelverlust

Knorpelpräparaten verfolgen.

### Biomechanische Verfahren

Die primäre Funktion des Gelenkknorpels, die Weiterleitung und Reduktion von mechnischen Belastungen sowie der Verringerung der Reibung, und seine komplexen mechanischen Eigenschaften haben ihn schon früh ins Interesse biomechanischer Untersuchungen gerückt. Die Charakterisierung von Gelenkknorpel über klassische Verfahren der Werkstoffprüfung (z. B. Kompressions-, Zug-, Relaxations- oder Kriechtests) wurde mehrfach durchgeführt und die Aussagen mit anderen Verfahren verglichen (vgl. Kap. 2.2.1 bzw. [15], [57], [98]). Problematisch bei diesen Untersuchungen ist immer die rasche Veränderung von Knorpel außerhalb seines natürlichen Mediums (z. B. Austrock-

**Tab. 2.3:** Histopathologische Einteilung von arthrotischem Gelenkknorpel nach Mankin [60]

Category	Subcategory	Score
Structure	normal	0
	surface irregularities	1
	pannus and surface irregularities	2
	clefts to transitional zone	3
	clefts to radial zone	4
	clefts to calcified zone	5
Cells	complete disorganisation	6
	normal	0
	diffuse hypercellularity	1
Safranin O Staining	cloning	2
	hypocellularity	3
	normal	0
	slight reduction	1
Tidemark integrity	moderate reduction	2
	servere reduction	3
	no dye noted	4
Total	intact	0
	crossed by blood vessels	1
		0–14

nung) und bei längerer Nichtbelastung. Neuere Verfahren versuchen deshalb, die mechanischen Eigenschaften des Knorpels *in vivo* zu bestimmen. Mieminen et al. zeigten [70], dass sich das Elastizitätsmodul (Youngmodul) mittels MRT mit bis zu 87% Übereinstimmung bestimmen lässt. Auch werden mechano-akustische Methoden entwickelt, die auf der Basis von Ultraschall nicht nur die Knorpeldicke, sondern auch die mechanischen Eigenschaften von Knorpel bestimmen sollen [51], [71]. Yao et al. untersuchen die Möglichkeit, mittels eines Tasthakens, in dem ein Beschleunigungssensor integriert ist, die Charakterisierung von Knorpeloberflächen zu objektivieren [115] und konnten nachweisen, dass sich dadurch Risse in knorpelähnlichen Kunststoffen signifikant häufiger finden lassen.

### Optische Verfahren

Neben den klassischen optischen Laborverfahren (Mikroskopie mit z. T. Färbeverfahren oder Fluoreszenztechniken) sind auch neuere Methoden in der Entwicklung, um die Diagnostik von Arthrose zu verbessern. Durch IR-Mikroskopie konnten Camacho et al. zeigen, dass sich Kollagen und Protaglykan in Gelenkknorpel ohne weitere Präparation darstellen lassen [19]. Durch die Untersuchung der Polarisationsseigenschaften von Knorpelgewebe konnten ex vivo Rückschlüsse auf den Arthrosegrad geschlossen werden [25]. Bei der optischen in vivo Diagnostik wird z. Z. vor allem die optische Kohärenztomografie (OCT) untersucht [41], [77], [117]. Dieses Verfahren erlaubt relativ schnell (ca. 0,5 s - 5 s) 2D-Schnittbilder bzw. 3D-Volumina von Knorpel aufzunehmen. Deren Interpretation bezüglich des Arthrosegrades ist jedoch noch nicht sicher geklärt. Trotz der relativ komplexen Technik und der notwendigen Sonden wurde bereits ein OCT-Handgerät vorgestellt [54]. Setzt man optische Kontrastmittel ein, die sich sensitiv mit Arthrosemarkern verbinden, kann z. B. über Fluoreszenzbildgebung der Knorpel untersucht werden, wie z. B. Lai et al. [52] mit NIR-Fluorophoren demonstriert haben. Über photoakustische Bildgebung konnten Sato et al. viskoelastische Eigenschaften von Knorpel beschreiben. Keines dieser Verfahren wird z. Z. in der klinischen Routine eingesetzt [90].

#### 2.2.4 Therapie

Weil eine kausale Therapie zur Arthrose-Heilung noch unbekannt ist, stehen bei der Therapie Schmerzlinderung, Erhöhung von Beweglichkeit und Gehleistung sowie die Verzögerung der Arthrose im Vordergrund.

Die erste Behandlungsstufe wird überwiegend ambulant durchgeführt und stützt sich primär auf physikalische und medikamentöse Therapien. Lokal werden zumeist kortisonfreie entzündungshemmende Salben angewandt. Injektionen mit Kortison-Präparaten lindern bei fortgeschrittenen Kniearthrosen vorübergehend die Schmerzen. Kältetherapie wirkt entzündungshemmend

und schmerzlindernd, Physiotherapie soll den Stoffwechsel des Knorpels stärken und den Stützapparat so aufbauen, dass die Gelenke entlastet werden. Auch die Korrektur von falschen Bewegungsmustern ist sinnvoll. Mittels Akupunktur kann ebenfalls eine Schmerzlinderung erreicht werden, auch wenn die Wirkung nicht anhaltend ist [113]. Operativ können eine Reihe von kleineren und größeren Eingriffen vorgenommen werden. Nach einer Spülung des Gelenkes (Lavage) bei Vorliegen eines Knorpelschadens kann ein deutlicher Rückgang der Symptomatik beobachtet werden. Dies lässt sich dadurch erklären, dass aus dem Verbund ausgelöste Knorpelfragmente, wie Kollagenfasern und Proteoglykanaggregate, als Entzündungsmediatoren auf die Synovialis (Gelenksinnenhaut) wirken und so eine chronische Synovialitis unterhalten. Gleiches gilt für das Knorpeldebridement (*shaving* oder Trimmen), die Entfernung oberflächlicher hypermobiler Knorpelschichten [31]. Achsenkorrigierende Osteotomien können Knorpeldefekte entlasten und ihr weiteres Fortschreiten verlangsamen, wenn dadurch eine unphysiologische Tragachse korrigiert werden kann und diese ursächlich für das Entstehen des Schadens ist. Andere Behandlungsmethoden versuchen das Knochenmark zu stimulieren und dadurch den Krankheitsverlauf zu hemmen. Durch sogenannte *Shaver/Acromionizer* wird die sklerosierte, subchondrale Knochenplatte bis ins Spongiose abgetragen. Im Gegensatz zum *drilling*, bei dem Knorpel und Knochen durch kleine Bohrungen verletzt werden, wird beim *micro fracturing* die subchondrale Schicht mit speziellen *picks* perforiert, ohne dass Bohrnekrosen oder knöcherne Defekte auftreten [31]. Durch diese Eingriffe kann erreicht werden, dass in den behandelten Arealen eine Neubildung von Knorpelgewebe beobachtet wird. Dabei handelt es sich jedoch nicht um reinen hyalinen Knorpel, sondern eher um ein Hybrid zwischen Faser- und Gelenkknorpel, der jedoch zu einer Schmerzlinderung und einer erhöhten Beweglichkeit führen kann [7]. Die Transplantation von Gelenkknorpel als Teil einer osteochondralen Einheit wird besonders bei posttraumatischen Schäden eingesetzt, wobei sowohl autologe als auch allogene Transplantate zum Einsatz kommen. Neue Therapieformen werden im Tissue Engineering entwickelt, wobei entweder aus Chondrozyten oder adulten Stammzellen neue Knorpelmatrizen gezüchtet werden. Dies wird zur Zeit unter Zuhilfenahme von Wachstumsfaktoren

und spezieller Trägermaterialien durchgeführt, neuere Forschungen zeigen jedoch, dass alternativ auch trägerfreie Implantate gezüchtet und implantiert werden können [84]. Neben fertig ausgeformten Knorpelmatrizen werden auch Zellen in den verschiedenen Stadien ihrer Differenzierung durch Injektion einer Lösung transplantiert [38]. Pharmakologisch konzentriert sich die Behandlung von Arthrose auf die Schmerzbehandlung, wobei hauptsächlich nichtsteroidale Entzündungshemmer und Analgetika zum Einsatz kommen. Der Einsatz von spezifischen Cyclooxygenase-2 (COX-2)-Hemmern wird zur Zeit erprobt, jedoch werden die Nebenwirkungen noch nicht beherrscht [80]. Neuere Studien zeigen, dass auf molekularer Ebene der katabolische Prozess, der zur Zerstörung des Gelenkknorpels führt, durch entsprechende Medikamente verlangsamt werden kann [80]. Wurden alle anderen Therapieoptionen ohne wesentlichen Erfolg ausgeschöpft, sind die Gelenkversteifung (Arthrodesis) und der künstliche Gelenkersatz (Endoprothese) die letzten Optionen. Der Einsatz von Stammzellen, Gentherapie oder die Kombination aus beiden ist Gegenstand aktueller Forschung, aber noch ohne klinische Relevanz [36], [32].

## 2.3 Entwicklungsbedarf und Aufgabenstellung

Da die Pathogenese der Arthrose noch weitgehend unbekannt ist, ist eine auf kausalen Zusammenhängen basierende sichere Diagnose nicht möglich. Aktuelle medizinische Verfahren können frühe Stadien nicht darstellen oder sind aufgrund ihrer Invasivität nicht zur Befundung geeignet. Mit einer Möglichkeit zur objektiven Diagnose würde die Möglichkeit geschaffen, den Krankheitsverlauf genauer zu untersuchen, Therapieerfolge zu validieren und damit die Heilungschancen zu verbessern. Eine Behandlung könnte sich genau auf das pathologische Areal beschränken, ohne Frühstadien zu übersehen oder intakten Knorpel zu verletzen. Im Tissue Engineering wäre es möglich, vor der Entnahme von Zuchtzellen zu überprüfen, ob diese Zellen bereits einen Befund aufweisen. Ein ideales System würde es dem behandelnden Arzt ermöglichen, alle Gelenke nicht invasiv auf das Vorhandensein und den Fortschritt von Arthrose zu untersuchen und genaue Informationen über die Lage und das Ausmaß der Erkrankung, auch während einer Behandlung, zu erlangen.

Moderne bildgebende Verfahren sind in der Lage, Hinweise auf Arthrose zu geben, allerdings sind sie bei Frühstadien noch sehr unsicher. Die MRT ist dabei die erfolgsversprechendste Modalität, doch noch haben die im klinischen Alltag eingesetzten Geräte eine zu geringe Feldstärke für die benötigte Ortsauflösung und sind für die Überwachung von chirurgischen Eingriffen ungeeignet. Biochemische und histologische Untersuchungen können bei der Befundung sehr nützliche Erkenntnisse liefern, doch sind sie mit einer den Knorpel zerstörenden Biopsie verbunden, so dass sie zur Früherkennung nicht geeignet sind. Miniaturisierte biomechanische Sonden könnten wichtige Erkenntnisse über die Veränderung von Knorpel liefern, sind jedoch in einem Stadium, in dem sie noch nicht routinemäßig eingesetzt werden können. So ist der Arzt bisher auf die beschränkt aussagekräftigen klassischen bildgebenden Verfahren angewiesen, die er während Arthroskopien durch den visuellen und haptischen Eindruck konkretisieren kann.

Da eine bildgebende, nicht invasive Lösung wahrscheinlich noch mehrere Jahre nicht für den Routinegebrauch vorhanden sein wird und während eines Ein-

griffs nur sehr begrenzt einsetzbar sind, besteht der größte Handlungsbedarf zur Zeit bei der Unterstützung von Chirurgen bei der Diagnostik während der Arthroskopie. Ein solches Messsystem sollte folgende Punkte erfüllen:

### 2.3.1 Identifikation des Entwicklungsbedarfs

**Schnelligkeit:** Dem Arzt muss möglichst schnell (ideal sofort) ein Befund über die untersuchte Knorpelstelle zur Verfügung stehen, damit er die Therapieentscheidung treffen kann. Eine Verlängerung der Operationszeit führt zu einer größeren Belastung für den Patienten und ist unwirtschaftlich.

**Medizinisches Umfeld:** Da als Einsatzfeld in vivo Messungen vorgesehen sind, darf das Risiko für Patient und Benutzer bei Anwendung des Messverfahrens den Nutzen nicht übersteigen. Die Rahmenbedingungen für medizintechnische Anwendungen müssen beachtet werden.

**Aussagekraft:** Das Messsystem muss gegenüber den herkömmlichen bildgebenden Diagnoseverfahren einen deutlichen Informationsgewinn liefern. Das betrifft sowohl die Genauigkeit als auch die Reproduzierbarkeit.

**Wirtschaftlichkeit:** Dem steigenden Kostendruck im Gesundheitssystem sollte Rechnung getragen werden. Bei einer Pauschale von wenigen tausend Euro pro Arthroskopie darf ein solches System den Material-, Personal- und Zeitaufwand nicht deutlich steigern.

### 2.3.2 Ableitung der Aufgabenstellung

Der Entwicklungsbedarf in Kombination mit dem Ansatz, diese Aufgabe mit der NIR-Spektroskopie zu erfüllen, führt zu den folgenden Arbeitsaufgaben:

1. **Vorversuche:** Anfangs soll in einer Machbarkeitsabschätzung die grundsätzliche Eignung der NIR-Spektroskopie zur Unterscheidung von gesundem und erkranktem Knorpel abgeschätzt werden. Ergänzend dazu soll ein Vergleich ausgewählter optischer Eigenschaften im UV/VIS von Knorpel und von Kollagen II klären, ob eine Erweiterung des Spektralbereichs auf diese Wellenlängenbereiche zur Unterstützung der NIR-Spektroskopie sinnvoll ist.
2. **Geräteentwicklung:** Ein auf das Messszenario angepasstes Messsystem ist aufzubauen und es ist zu überprüfen, ob es die Anforderungen für den späteren Einsatz im medizinischen Umfeld erfüllen kann. Zusätzlich soll der Kostenfaktor berücksichtigt werden.
3. **Verfahrensentwicklung:** Es soll untersucht werden, inwieweit mittels NIR-Spektroskopie diagnostisch relevante Aussagen über Knorpelgewebe möglich sind. Dies soll einmal über den direkten Vergleich von nativen und durch Tissue Engineering erzeugten Knorpel bekannter Zusammensetzung erfolgen. In einer zweiten Versuchsreihe wird die NIR-Spektroskopie mit klassischen medizinischen Diagnoseverfahren zur Bewertung von Knorpel verglichen.
4. **Biomechanische Untersuchungen:** Die mechanischen Eigenschaften von Gelenkknorpel sind ein aussagekräftiges Merkmal seiner Funktionsfähigkeit. In einer Versuchsreihe soll geklärt werden, ob durch ein chemometrisches Modell die mechanischen Eigenschaften von Knorpel aus seinen Spektren vorhergesagt werden kann. In einer weiteren Versuchsreihe soll untersucht werden, inwieweit Knorpel durch mechanische Belastung, wie sie bei der spektroskopischen Untersuchung auftritt, seine spektralen Eigenschaften verändert.

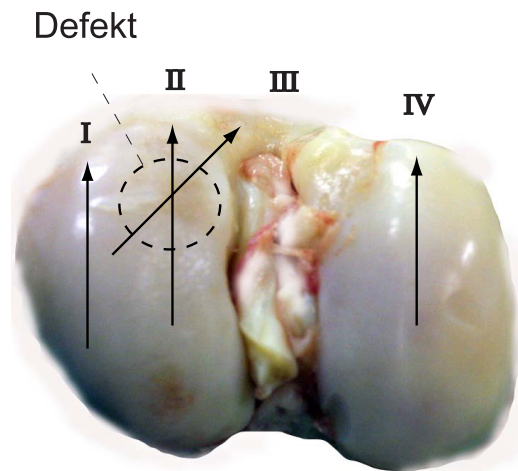


## **3. MATERIAL UND METHODEN**

### **3.1 Vorversuche**

#### **3.1.1 Machbarkeitsabschätzung**

Um die grundsätzliche Eignung des Verfahrens zu überprüfen, wurden Kniegelenke von Schlachtschweinen mit deutlichem Knorpelschaden untersucht. Die Wahl des Tiermodells lag darin begründet, dass die Gelenke leicht verfügbar sind und häufig Knorpelschäden aufweisen. Die Gelenkkapseln der Explantate wurden ca. drei Stunden post mortem geöffnet und die Gelenkflächen freipräpariert. Anschließend wurden die Gelenkflächen von einem Chirurgen nach Outerbridge klassifiziert. Es wurden zwei Femurkondylen, bei denen drittgradige Arthrose diagnostiziert wurde, für die Untersuchung ausgewählt. Als Referenz wurde ein Keramik-Standard mit 40 % Reflektanz eingesetzt. Von den Knorpelflächen wurden kontinuierlich Spektren aufgenommen (10 Spektren pro Sekunde), wobei die Sondenspitze plan auf die Knorpeloberfläche aufgesetzt und entlang festgelegter Bahnen (vgl. Abb. 3.1, I-IV) bewegt wurde. Die zeitliche Abfolge der Spektren korrespondiert in etwa mit der Position der Sonde auf der Gelenkfläche. Die Bahnen I und IV wurden so gewählt, dass nur offensichtlich gesunder Knorpel gemessen wurde, II und III beginnen auf gesundem Gewebe, überstreichen die Schadensfläche und enden wieder auf gesundem Knorpel.



**Abb. 3.1:** Porkiner Femurkondylus mit Knorpeldefekt und Bahnen, entlang derer Messungen durchgeführt wurden

### 3.1.2 UV-VIS-Spektroskopie

Für die Untersuchung der optischen Eigenschaften von Knorpel im UV-VIS-Bereich wurde hyaliner equiner Knorpel von Schlachtpferden mit daraus gewonnenem Kollagen Typ II verglichen, um einen Aspekt der Arthrose, die Veränderung des Verhältnisses der Grundbestandteile der Kollagenmatrix (Wasser, Kollagen, Protoglykan), zu charakterisieren. Die Präparate wurden in der Abteilung Tissue Engineering des fzmb, die sich mit der Herstellung von Knorpelimplantaten für Pferde beschäftigt (vgl. 3.3.1), hergestellt und freundlicher Weise zur Verfügung gestellt. Das aus dem Knorpel gewonnene Kollagen II lag gefriergetrocknet vor und konnte in Essigsäure gelöst werden [112]. Deshalb wurde der Knorpel für diese Untersuchungen ebenfalls gefriergetrocknet oder zerkleinert in Essigsäure suspendiert. Untersucht wurden die Absorption und die Eigenfluoreszenz beider Proben, da diese Untersuchungen auch mit der für die NIR-Spektroskopie vorgesehenen Messsonde möglich sind.

### UV-VIS-Absorption

Die Extinktionsmessung wurde an Proben in 5% Essigsäure ( $C_2H_4O_2$ ) durchgeführt, da das Messgerät für die Untersuchung von Flüssigkeiten in Transmission konfiguriert war. Neben den Proben wurde auch reine Essigsäure und, als Referenz, eine leere Küvette aufgenommen. Die Extinktionsspektren für die Berechnung der Absorptionsspektren wurden mit einem FT-UV/VIS/NIR-Spektrometer (V-550, Jasco) im Wellenlängenbereich von 195 nm bis 900 nm mit einer Auflösung von 1 nm aufgenommen. Von den Absorptionsspektren von Knorpelgewebe und Kollagen II wurde das Essigsäurespektrum subtrahiert.

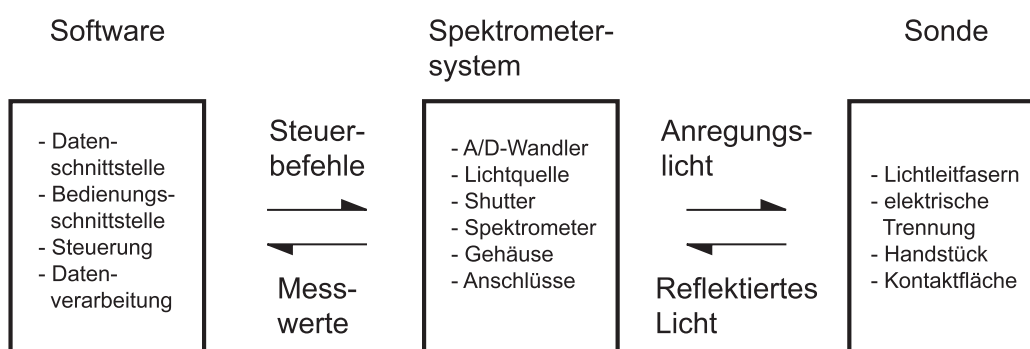
### UV-VIS-Autofluoreszenz

Excitation-Emission-Matrizen (EEM) zur Beurteilung der Autofluoreszenz wurden mit einem Fluoreszenzspektrometer (FP-6200, Jasco) aufgezeichnet. Die Proben konnten in der getrockneten Form präsentiert werden, wodurch die Autofluoreszenz der Essigsäure ausgeschlossen werden konnte. Die Anregung (Excitation) erfolgte in einem Wellenlängenbereich von 270 nm bis 650 nm mit einer Schrittweite von 1 nm. Fluoreszenzspektren (Emission) wurden für jede Anregungswellenlänge im Bereich von 285 nm bis 730 nm mit einer Auflösung von 1 nm bestimmt.

## 3.2 Geräteentwicklung

Ziel der Entwicklung war es, ein System aufzubauen, das dem Arzt grundsätzlich ermöglicht, während einer Arthroskopie zusätzliche Informationen über den Zustand des Knorpels zu sammeln. Als Randbedingungen waren dabei zu beachten, dass dadurch der Arzt bei dem Eingriff allenfalls gering beeinträchtigt und die Operationszeit nicht wesentlich verlängern werden. Es

waren Sicherheitsaspekte zum Schutz von Patient und Arzt sowie der Schutz vor Datenverlust zu beachten. Mit Hinblick auf eine spätere Produktentwicklung wurde Wert auf eine wirtschaftliche Umsetzbarkeit gelegt. Das Gesamtsystem lässt sich, wie in Abb. 3.2 dargestellt, in drei Teilsysteme gliedern: das Softwarepaket für die Kommunikation und die Datenverarbeitung, das Spektrometersystem als Zusammenfassung aller aktiven Komponenten und die Sonde für Lichttransport und Reflexionsmessung.



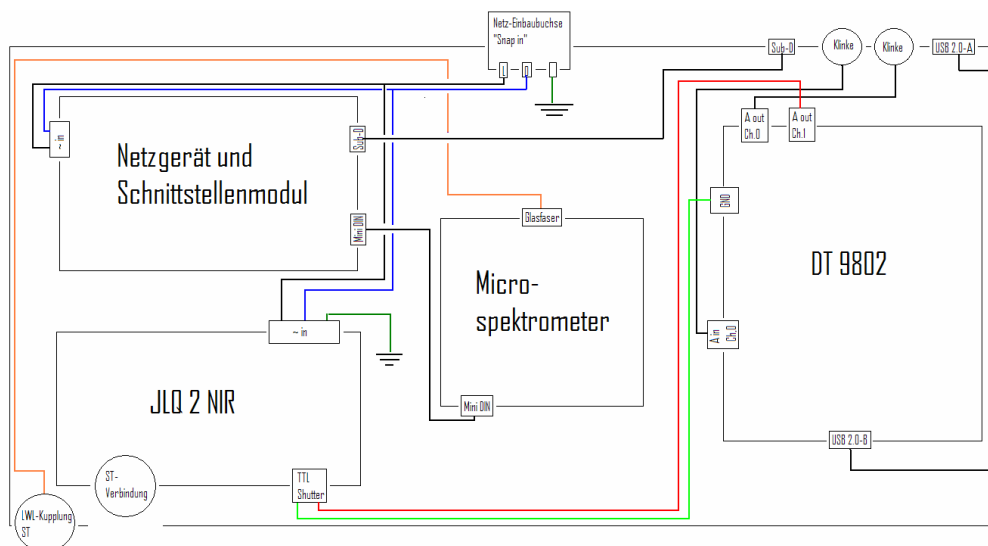
**Abb. 3.2:** Komponenten und Schnittstellen der Teilsysteme des Messsystems

### 3.2.1 Spektrometersystem

Die aktiven (elektrischen) Komponenten der Messtechnik wurden zu einem gehausten System kombiniert, das vor allem der Bereitstellung der Beleuchtung und der spektralen Analyse des reflektierten Lichts dient. Zusätzlich wird der Schutz des Benutzers vor elektrischer und elektromagnetischer Energie sowie die Minimierung der Fehlbedienung sicher gestellt.

Das Spektrometersystem setzt sich aus der Lichtquelle, dem Spektrometer, einer A/D-Wandlerkarte, den Netzteilen der Geräte sowie Haltevorrichtungen, Strom- und Datenleitungen und Gehäuse zusammen. Der Anschluss an die externe Stromversorgung, Ein- und Auskopplung des Lichts und der Datentransfer zur Software erfolgten über spezielle Steckverbindungen am Gehäuse (vgl. Abb. 3.5). Die Verschaltung der Komponenten und die Lage und Art

der Anschlüsse sind in Abb. 3.3 schematisch dargestellt.



**Abb. 3.3:** Verschaltung der elektrischen Komponenten des Spektrometersystems (Lichtquelle inkl. Shutter (JLQ 2 NIR), Spektrometer (Microspektrometer), A/D-Wandler (DT 9802) und Netzgerät) sowie die Lage und Art der Anschlüsse

Als Lichtquelle wurde eine leistungsstarke, geregelte Halogenlampe (JLQ 2 NIR, JETI, Abb. 3.4 (b)) eingesetzt, die für den NIR-Bereich optimiert ist. Netzteil, Regelelektronik und TTL-Shutter sind in einem Gehäuse integriert. Der visuelle Anteil der Strahlung wird über einen Glas-Hochpass-Filter ausgeblendet. Lediglich ein Teil des grünen Wellenlängenbereichs wird ausgekoppelt, um die Funktion der Lichtquelle auch visuell prüfen zu können und damit eine unbeabsichtigte Strahlenexposition zu verhindern. Der Anschluss der Lichtleitfaser erfolgt über eine SMA-Verbindung. Der TTL-Shutter wird über die A/D-Wandlerkarte (USB Data Acquisition Function Module DT9802, Abb. 3.4 (c)) angesprochen und gesteuert. Die A/D-Wandlerkarte wird über einen USB-Anschluss mit dem Computer verbunden.

Zur Detektion wurde ein Diodenzeilen-Mikrospektrometer (NIR 1.7, micro-Parts, Abb. 3.4 (a)) gewählt. Sein optisches System ist ein monolithisch in LIGA-Technologie gefertigtes Gitterspektrometer, die Energien der aufgeteilten Wellenlängenbereiche werden mittels einer 128 Pixel InGaAs-Diodenzeile

in elektrische Spannung umgewandelt. Es ist spezifiziert für Messungen in einem Wellenlängenbereich von 1.100 nm bis 1.700 nm mit einer Auflösung von 16 nm ( $\Delta\lambda_{FWHM}$ ), wobei 56 Pixel der Diodenzeile genutzt werden. Das Spektrometer ist in einem isolierten Gehäuse mit eigenem A/D-Wandler integriert, Signal- und Datentransfer erfolgen über eine serielle Schnittstelle RS-232. Da keine beweglichen Teile benötigt werden und die optischen Komponenten auf einer sehr kleinen Plattform integriert sind, ist das Spektrometer stabil gegen Erschütterungen und mäßige thermische Schwankungen. Durch die für die Massenfertigung geeignete Herstellungsweise und die relativ geringe Wellenlängenauflösung ist damit eine Produktentwicklung mit Herstellungskosten weit unter dem Preis gängiger Laborspektrometer möglich.

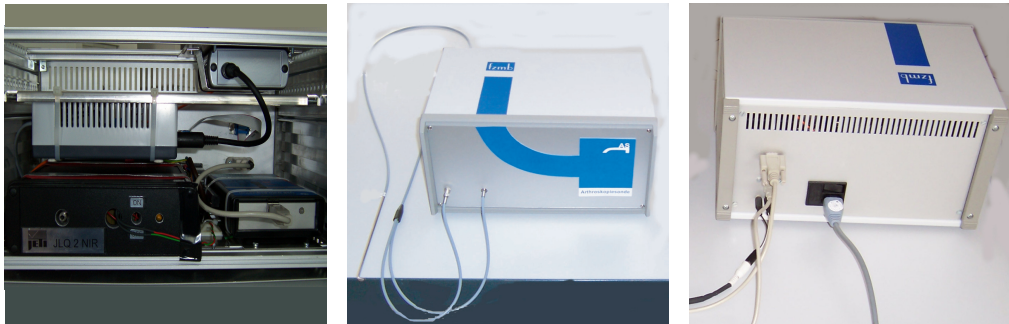


(a) Mikrospektrometer NIR 1.7 [10] (b) Lichtquelle JLQ 2 NIR [47] (c) A/D-Wandler DT9802 [22]

**Abb. 3.4:** Aktive Komponenten des Spektrometersystems

Zum Schutz der Benutzer, der Geräte und zur Vermeidung von Problemen durch Fehlanlüsse wurden die Einzelkomponenten in einem geerdeten Gehäuse (Schutzart IP20) zusammengefasst. Die Komponenten wurden im Gehäuse fixiert und verbunden, ihre Netzteile an die zentrale Stromversorgung angeschlossen und über einen Schutzleiter mit dem Gehäuse verbunden. Der Hauptschalter, der Anschluss für die externe Stromversorgung sowie die Steckplätze für die Datenübertragung (USB und RS-232) befinden sich auf der Rückseite (Abb. 3.5 (c)), der Anschluss der Beleuchtungsfasern der Sonde an die Lichtquelle über einen SMA-Anschluss und die Verbindung der Detektionsfaser an das Spektrometer über einen ST-Anschluss an der Vorderseite. Da kein Anschluss doppelt verwendet wird und für die Messung alle

Anschlüsse belegt sein müssen, ist Fehlanschlüssen vorgebeugt.



(a) Innenansicht

(b) Vorderansicht mit ange-  
schlossener Sonde

(c) Rückansicht mit Strom-  
versorgung und Datenkabel

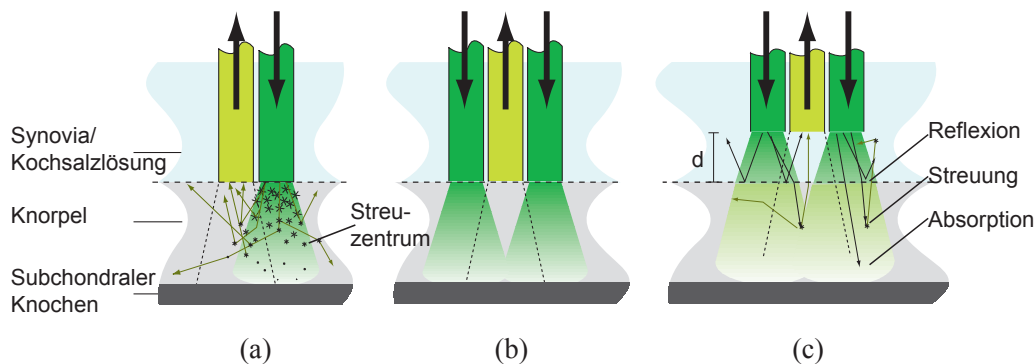
**Abb. 3.5:** Spektrometersystem des Messsystems

### 3.2.2 Sonde

Die faseroptische Sonde wurde unter zwei Gesichtspunkten ausgelegt. Einmal sollte die Messung der optischen Eigenschaften des Knorpels möglich sein, zum anderen sollte die Sonde weitgehend die Funktion eines chirurgischen Tasthakens übernehmen können, um einen Instrumentenwechsel während der Arthroskopie zu vermeiden.

Da Transmissionsmessungen in vivo nicht möglich sind, wurde das Verfahren der diffusen Reflexionsmessung gewählt. Dazu werden die Beleuchtungsfasern plan auf die Knorpeloberfläche aufgesetzt, so dass Licht entweder in den Knorpel eindringt oder in die Beleuchtungsfasern reflektiert wird. Ein direktes Übersprechen auf die ebenfalls plan aufliegende Detektionsfaser ist nicht möglich. Das eingestrahelte Licht wird im Knorpel entweder absorbiert oder gestreut. Licht kann nur an das Spektrometer geleitet werden, wenn es rückgestreut wird und in einem Winkel auf die Eintrittsfläche der Detektionsfaser trifft, der unterhalb des Akzeptanzwinkels  $\theta_a$ <sup>1</sup> der Faser liegt. Das

<sup>1</sup> Der maximale Winkel, unter dem Licht auf einen Lichtleiter fallen darf, um in diesem



**Abb. 3.6:** Prinzip der faseroptischen Reflexionsmessung. Kontakthafte Messung mit einer Beleuchtungsfaser und einer Detektionsfaser (a) und mit zwei Beleuchtungsfasern (b) sowie bei Messung mit Abstand zur Oberfläche (c)

letzte Streuzentrum muss also in einem Kegel liegen, der durch den Akzeptanzwinkel und dem Durchmesser der Detektionsfaser gegeben ist, damit das durch ihn gestreute Licht zum Signal beitragen kann (vgl. Abb. 3.6 (a)).

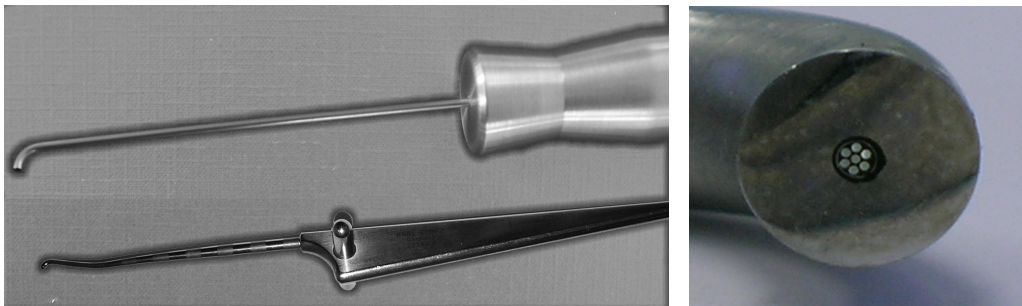
Da die Extinktion  $E$  des Lichts nach dem Lambert-Beerschen Gesetz  $E = \epsilon cd$  (mit dem molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$ , der Konzentration der Absorber  $c$  und der Weglänge  $d$ ) logarithmisch mit der Eindringtiefe zunimmt, wird ein Großteil des detektierbaren Lichts aus den oberen Schichten rückgestreut. Eine Beleuchtung mit mehreren Fasern (vgl. Abb. 3.6 (b)) vergrößert das signalgebende Volumen und damit die Intensität des Signals. Wird die Messung mit einem Abstand zwischen den Faserausgängen und der Knorpeloberfläche (vgl. Abb. 3.6 (c)) durchgeführt, kommt es zu einer Vergrößerung des signalgebenden Volumens und der Knorpel wird durch die Aufdruckkraft beim Aufsetzen der Sonde nicht beeinflusst. Problematisch dabei ist aber, dass das Medium zwischen Knorpel und Sonde abstandsabhängig absorbiert und Licht von der Knorpeloberfläche in die Detektionsfaser reflektiert wird. Um diese Einflussfaktoren zu korrigieren, muss der Abstand bei der Messung bestimmt werden, was die Messung erheblich erschweren würde. Aus diesem Grund werden die Reflexionsmessungen kontakthafte durchgeführt.

---

noch durch Totalreflexion weitergeleitet werden zu können. Sein Wert ist abhängig vom Material und der Herstellungsweise der Lichtleitfaser.



Das Endstück der Sonde besteht aus einem Edelstahlrohr, in dem die Fasern geführt und um  $90^\circ$  gebogen werden, sowie einem Handgriff. Es entspricht in seinen Dimensionen einem chirurgischen Tasthaken und kann ebenso zum Palpieren der Knorpeloberfläche gebraucht werden (vgl. Abb. 3.7 (a)). Die Lichtleitfasern bestehen aus *OH*-freiem Quarzglas, wobei die sechs Beleuchtungsfasern ( $\varnothing 200 \mu\text{m}$ ) als Faserbündel um die Detektionsfaser ( $\varnothing 200 \mu\text{m}$ ) angeordnet sind (verg. Abb. 3.7 (b)). Das Faserbündel ist außerhalb des Endstücks mit einem hitzebeständigen Kunststoff ummantelt. Die Lichtleitfasern teilen sich nach einer Länge von 2,5 m in einem Y-Stück aus Kunststoff auf zwei 50 cm lange Fasern zum Anschluss an das Spektrometersystem.



(a) Sonde (oben) und chirurgischer Tasthaken (unten) (b) Sondenspitze mit Faserenden

**Abb. 3.7:** Eine Reflexionssonde des Messsystems im Vergleich mit einem chirurgischen Tasthaken (a) und die Kontaktfläche mit Fasern der Sonde (b)

### 3.2.3 Software

Das Programmpaket setzt sich aus zwei Modulen zusammen, einem für die Steuerung und Messwerterfassung und einem für die anschließende Datenverarbeitung. Im ersten Modul wurden die Benutzerführung, die Kommunikation mit der Messtechnik, die Datenerfassung und die Visualisierung des Messverlaufs in der graphischen Entwicklungsumgebung Agilent VEE 6.0 erstellt. Eine graphische Oberfläche (Abb. 3.8) führt den Benutzer durch die

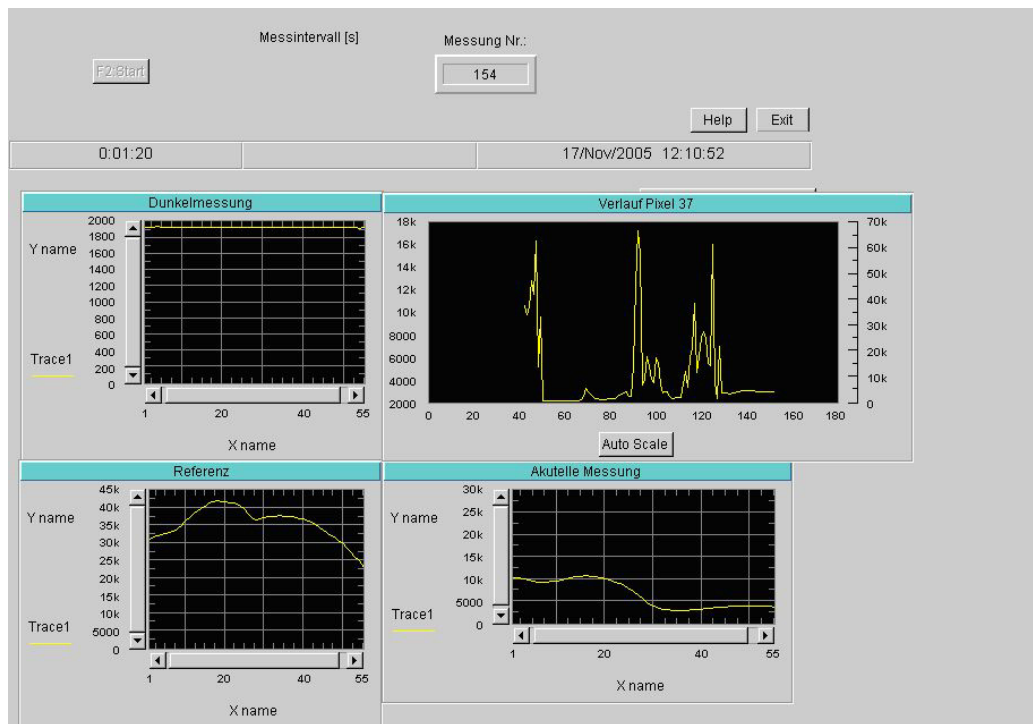
einzelnen Schritte des Messvorgangs.

Die Messung beginnt mit der Festlegung der Datendatei, wobei aus Sicherheitsgründen das Überschreiben einer bereits bestehenden Datei erst nach Bestätigung durch den Benutzer möglich ist. Danach wird der Benutzer aufgefordert, das Intervall zwischen den Messungen festzulegen und eine Referenzmessung durchzuführen. Anschließend werden kontinuierlich Spektren aufgezeichnet und abgespeichert, so dass auch ein Fehler, z. B. ein Stromausfall, nicht zu einem Datenverlust führt. Zur Information des Benutzers werden Datum, Uhrzeit, Name der Messdatei und Anzahl der durchgeführten Messungen angezeigt. Graphisch dargestellt werden das Dunkelspektrum, das Referenzspektrum, das aktuelle Messspektrum (als Absorptionsspektrum) und der Zeitverlauf des Messwerts (in Counts) des Pixels bei der Wellenlänge 1.450 nm.

Da für ein gleichmäßiges Beleuchtungsspektrum die Lichtquelle kontinuierlich betrieben werden muss, wird zur Sicherheit des Benutzers und zur Aufzeichnung des Dunkelspektrums der Lichtaustritt durch einen integrierten TTL-Shutter gesteuert. Nur während der Messung wird der Shutter durch die Software geöffnet, um ein versehentliches Austreten von Strahlung zu verhindern.

Nach einem Hardwaretest werden die Einstellungen des Spektrometers (Integrationszeit, Verstärkungsfaktor, zu messender Wellenlängenbereich, Temperaturregelung) aus einer externen Konfigurationsdatei eingelesen und an das Spektrometer übermittelt. Während der Messung wird das Spektrometer im festgelegten Intervall zum Auslesen der Detektorzeile aufgefordert. Die übermittelten Messwerte werden zusammen mit den Konfigurationseinstellungen, Datum und Uhrzeit der Einzelmessungen sowie der Dunkel- und der Referenzmessung in eine Datei im ASCII-Format geschrieben.

Für die Auswertung der erhobenen Messdaten wurde ein Modul in der Sprache Matlab R13 entwickelt. Nach dem Einlesen der Rohdaten wurde für jedes Messspektrum ein Element in einer Datenbank (vgl. Abb. 3.9) angelegt.

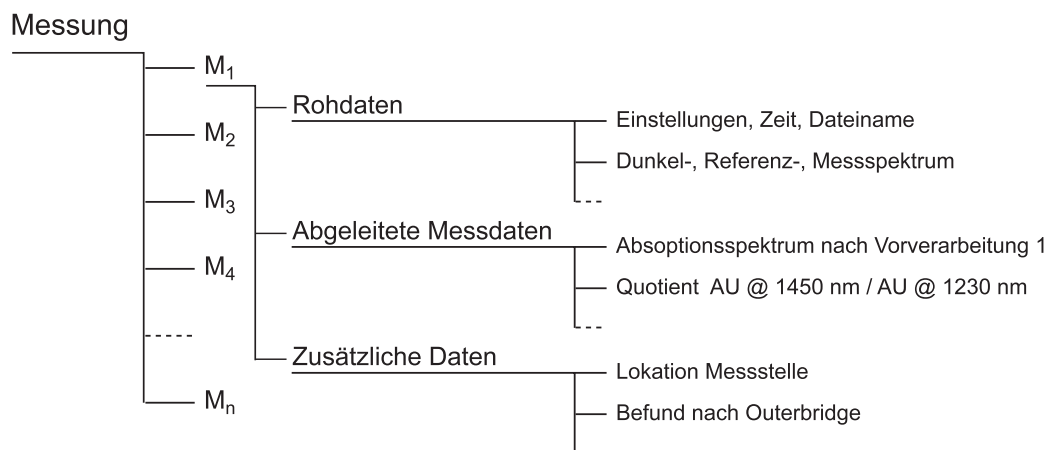


**Abb. 3.8:** Bedienungsoberfläche des Messsystems mit Onlinedatenanzeige der Spektrennummer (Messung Nr.), der Dunkelmessung, des Zeitverlaufs des Messwerts des Pixels 37 des Spektrometers, der Referenzmessung und des aktuellen Spektrums

Jedes dieser Elemente beinhaltet die unverarbeiteten Messdaten (Dunkel-, Referenz- und Messspektrum) sowie Datum und Uhrzeit, Konfiguration des Messsystems bei der Messung, Pfad und Dateiname der ASCII-Datei. Die Ergebnisse der Datenverarbeitung und die dazugehörigen Parameter werden den entsprechenden Elementen zugeordnet. Über eine Eingabemaske können den Datenzellen zusätzliche Informationen wie klinische Daten (z. B. Befund oder die Lokalisation der Messstelle) oder die Systemversion angefügt werden. Die Daten einzelner Experimente können zu größeren Datenbanken mit mehreren zehntausend Elementen kombiniert werden.

Durch logische Kombination von Merkmalen innerhalb einer Datenbank können Datenvektoren bzw. -matrizen generiert werden. So ist es beispielsweise möglich, alle Absorptionswerte bei 1.450 nm auszugeben, die in einem bestimmten Zeitintervall am lateralen Tibiaplateau aufgenommen wurden,

keinen klinischen Befund aufwiesen und deren Rohspektren mittels Vektornormierung vorverarbeitet worden waren. Diese Datenvektoren bildeten die Grundlage für die anschließende statistische Analyse.



**Abb. 3.9:** Struktur des Eintrags einer Messung in der Datenbank mit mehreren Einzelmessung  $M_i$

### 3.2.4 Systemsicherheit

Um die Sicherheit des Gesamtsystems - auch im Einsatz zur Untersuchung von Patienten während einer Arthroskopie - zu gewährleisten, wurden folgende Aspekte des Messsystems untersucht:

**Konformität:** Erfüllt das Gesamtsystem die Anforderungen zur elektromagnetischen Verträglichkeit gemäß EN60601-1-2:2001 und zur Gerätesicherheit gemäß EN60601-1:1990+A1:1993+A2:1995+A13:1996?

**Biokompatibilität:** Sind alle Systemkomponenten, die in direkten Kontakt mit dem Patienten kommen können, biokompatibel?

**Elektrische Sicherheit:** Sind bei normaler Benutzung und bei Störfällen der Benutzer und der Patient durch elektrischen Strom gefährdet?

**Wärmeentwicklung:** Wird durch die austretende Strahlung das Knorpelgewebe über einen physiologisch ungefährlichen Bereich hinaus erwärmt?

**Strahlenschutz:** Besteht, über die Erwärmung hinaus, durch die NIR-Strahlung eine Gefahr für Benutzer und Patient?

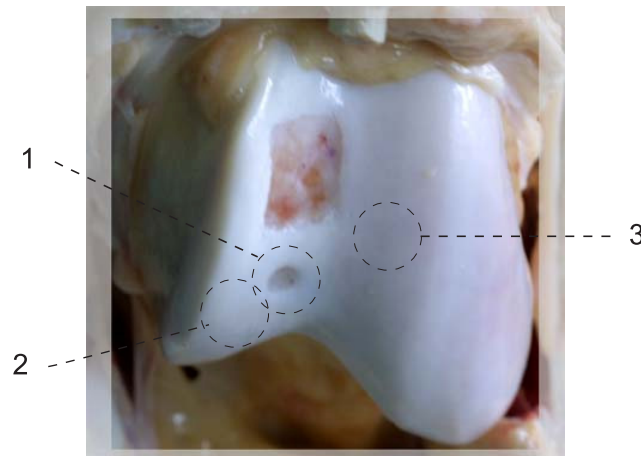
**Infektionsgefahr:** Können durch das Messsystem Infektionen übertragen werden?

## 3.3 Verfahrensentwicklung

### 3.3.1 Untersuchung von Knorpelimplantaten

Im Rahmen einer vergleichenden Studie wurde am fzmb eine Versuchsreihe durchgeführt, die alternativ zu Knorpeltransplantationen von osteochondralen Einheiten trägerfreie Knorpelimplantate (Neo-Knorpel) zur Therapie von Arthrose im equinen Tiermodell untersuchte [84]. Da sich Neo-Knorpel in seiner Zusammensetzung deutlich von nativem Knorpel unterscheidet, konnte so untersucht werden, ob dieser biochemische Unterschied zu Veränderungen von NIR-Spektren führt.

Dazu wurden bei drei Versuchstieren am medialen Fesselgelenk künstlich Läsionen mit 5 mm Durchmesser gesetzt. Diese Defekte wurden anschließend mit autologen Chondrozyten-Implantaten geschlossen und mit einem Ankersystem aus Titan befestigt. Zur Herstellung der Implantate wurden Chondrozyten aus Knorpelgewebe gewonnen und durch autologes Serum propagiert. Nach Kultivierung und Proliferation in einem Monolayer wurden die Kulturen durch manuelle Stimulation in eine dreidimensionale Struktur überführt. 9 und 12 Wochen nach Implantation wurden die Gelenkflächen in einer Operation freigelegt. Bevor Knorpel und Implantat für histologische Untersuchungen entnommen wurden, konnten spektroskopische Untersuchungen mit dem Messsystem durchgeführt werden.



**Abb. 3.10:** Mediales equines Fesselgelenk mit Neo-Knorpel-Implantat (1) und den Messstellen der Untersuchung (1-3)

Dazu wurde die Sonde plan auf die Gewebeoberfläche aufgesetzt und anschließend wurden zehn Spektren bei einer Integrationszeit von 0,1s aufgenommen. Untersucht wurden dabei sowohl das Implantat (Abb. 3.10, 1), als auch offensichtlich gesunder Knorpel (Abb. 3.10, 2) auf der medialen Seite des Gelenks. Als Referenz wurde die Reflexion gesunden Knorpels auf der lateralen Gelenkfläche (Abb. 3.10, 3) gemessen und daraus die Absorptionsspektren berechnet.

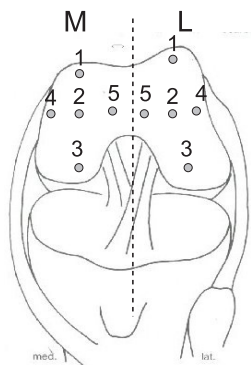
Zu Vergleichszwecken wurde Neo-Knorpel und equiner Knorpel biochemisch auf den Proteoglykan- und Hydroxyprolingehalt untersucht.

### 3.3.2 Untersuchungen am Schafsmodell

Zur Validierung des Verfahrens wurde eine Versuchsreihe am Schafsmodell (*Ovis orientalis aries*) durchgeführt. Ziel der Untersuchung war, die NIR-Spektroskopie mit der arthroskopischen Befundung nach dem ICRS-Protokoll [13] und eingeführten medizinischen Methoden zur Diagnose von Knorpelschäden zu vergleichen. Dazu wurden die Shorehärte (Shore A) als biomechanischer Parameter, der Wassergehalt als chemischer Parameter, Glucosaminoglykan- und Kollagengehalt als biochemische Parameter und die Knor-

peldicke sowie der Mankin-Score als histologische Parameter ausgewählt. Zusätzlich wurden die Lokalisation und die Fläche auftretender Knorpelschäden protokolliert. Hier wurde das Tiermodell Schaf gewählt, da durch eine Herde gleich alter Tiere eine einheitliche Probenpopulation gewährleistet werden konnte.

Für die Untersuchung wurden 30 Knieexplantate einer Herde weiblicher, drei Jahre alter Schafe verwendet. Die Explantate wurden bei 8°C gekühlt und ca. 24 Stunden post mortem gelagert. Direkt vor jeder Untersuchung wurden die Gelenkkapseln eröffnet, das weiche Gewebe entfernt und die Gelenkflächen freigelegt. Das Untersuchungsregime sah für die medialen und lateralen Kondylen folgende Schritte vor: Befundung nach ICRS und gegebenenfalls Bestimmung der Schadensfläche und -lokalisierung, Messung der NIR-Absorption, Bestimmung der Shorehärte, Messung des Wassergehalts und Entnahme von Proben für die biochemischen und histologischen Untersuchungen an definierten Messpunkten (vgl. Abb 3.11).



(a) Messstellen an den femoralen Kondylen



(b) Reflexionsmessung am medialen Kondylus

**Abb. 3.11:** Messstellen der Untersuchungen am Schafsmodell und Sonde während der Messung

Es wurden die einzelnen Methoden wie folgt realisiert: Die Befundung nach ICRS (Grad 0 bis IV) erfolgte durch einen erfahrenen Chirurgen analog zu

Arthroskopien durch Palpation mittels eines Tasthakens und durch optische Einschätzung.

Für die Ermittlung der Defektfläche wurde die Form einer Ellipse angenommen und Haupt- und Nebenachse mittels eines Messschiebers bestimmt.

Die NIR-Messung erfolgte mit Temperaturkontrolle des Spektrometers (30°C), interner Verstärkung, einer Integrationszeit von 2 ms und kontinuierlich im Intervall von 100 ms. Vor jeder Messung wurde als Referenz ein Keramik-Standard mit 40% Reflexion (Labsphere SRS-40-010) aufgenommen. Von jedem Messpunkt wurden ca. 10 Spektren aufgezeichnet (Messzeit ca. 1 s) und anschließend gemittelt. Daraus wurde das Absorptionsspektrum berechnet, auf den Mittelwert normiert und als singulärer Kennwert die mittlere Absorption des Bereichs 1.410 nm bis 1.580 nm bestimmt.

Als Kenngröße für die biomechanischen Eigenschaften wurde in dieser Versuchsreihe die Shorehärte bestimmt. Sie bezeichnet einen Werkstoffkennwert für Elastomere und Kunststoffe und ist in den Normen DIN 53505 und DIN 7868 festgelegt. Das verwendete Messgerät (Zwick Ulm) für die Shorehärte A besteht im Wesentlichen aus einem federbelasteten Stift, dessen Elastizität beim Eindringen in die Probe ein Maß für die entsprechende Shorehärte des Materials ist. Die abgestumpfte Spitze des Stifts entspricht einem Kegelstumpf mit einem Durchmesser von 0,79 mm und einem Öffnungswinkel von 35°. Die Messung wird mit einem Andruckgewicht von 1 kg und einer Andruckzeit von 15 s durchgeführt. Ein Wert von 0 bedeutet eine Eindringtiefe des Stifts von 2,5 mm oder mehr und eine Shorehärte von 100 eine Eindringtiefe von 0 mm [8]. Bei der Messung wurde teilweise die Knorpeloberfläche durch die Messspitze durchdrungen. Der Einfluss dieser Läsion auf die Ergebnisse der folgenden Untersuchungen wurde als sehr gering eingeschätzt, da der Wassergehalt unmittelbar danach bestimmt wurde und die Läsion keinen Einfluss auf Histochemie und Histopathologie haben sollte [104].

Der Wassergehalt wurde mittels eines speziellen Messgerätes (WDS 400, Sartorius AG) bestimmt, das die Verfahren Ofentrocknung, Coulometrie (Karl-Fischer-Titration) und die Phosphorpentoxid-Methode kombiniert. Es erlaubt die selektive Unterscheidung von Oberflächen-, Kapillar- und Kristallwasser bei einer Messgenauigkeit im ppm-Bereich [68]. Dazu wurde ca. 5 mg



Knorpelgewebe aus einem befundeten Bereich entnommen, gewogen und dem Gerät zugeführt. Die Zeit zwischen Öffnung des Gelenks und Bestimmung des Wassergehalts betrug  $10 \pm 5$  min, zwischen Entnahme der Gewebeprobe und Wägung 1 min. Als Messwert wurde der Gesamtwassergehalt in Gewichtsprozent verwendet.

Für die biochemische Analyse wurde aus befundeten Bereichen ca.  $10 \mu\text{g}$  Knorpelgewebe entnommen und bei  $-80^\circ\text{C}$  gefroren. Nach Denaturierung durch Natriumacetat wurden die Proben mit  $\alpha$ -Chymotrypsin und Proteinase K behandelt. Der Kollagengehalt wurde über ein Immunoassay bestimmt, Glucosaminglykan (als Maß für den Proteoglykangehalt, vgl. 2.2.1) über den Dimethylmethylen Blue Assay [5], [6].

Zur histologischen Untersuchung wurden mittels eines chirurgischen Meißels die Kondylen gespalten, ca. 1 mm dicke Knorpel-Knochen-Splitter aus befundeten Gebieten gewonnen und in Formaldehyd konserviert. Der Grad der Histopathologie wurde durch PAS, HE und Alcian-Blue-Färbungen bestimmt und die Knorpeldicke durch digitale Bildverarbeitung gemessen. Aus den Einzelwerten wurde der Mankin-Score berechnet [6].

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels SPSS 9.0 und Matlab R13. Die Korrelationskoeffizienten  $r$  wurden nach Bravais-Pearson mit den dazugehörigen Signifikanzen  $s$  berechnet. Zur Klassifizierung wurde eine einseitige Varianzanalyse (ANOVA) verwendet und das 95 %-Konfidenz-Intervall berechnet [67].

Messwerte mit Befund der Referenzmethode (m. B.) wurden als richtig positiv (rp) eingestuft, wenn ihr Betrag größer als die Untergrenze des Konfidenz-Intervalls der Klasse m. B. war, Werte mit Beträgen in diesem Bereich mit der Klassifizierung ohne Befund (o. B.) als falsch positiv (fp). Richtig negativ (rn) waren Werte o. B. kleiner als die Untergrenze des Konfidenz-Intervalls der Klasse m. B., falsch negativ (fn) Messwerte m. B. unterhalb dieser Grenze. Die Sensitivität ( $Se$ ) ergab das Verhältnis  $n_{rp}/(n_{rp} + n_{fp})$ , die Spezifität  $Sp$  analog als  $n_{rn}/(n_{rn} + n_{fn})$ .

## 3.4 Biomechanische Versuche

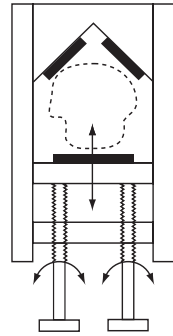
Eine Hauptaufgabe von Gelenkknorpel ist die Weiterleitung und Dämpfung von mechanischen Belastungen der Knochen. Seine mechanischen Eigenschaften sind daher ein direkter Indikator für seine Funktionsfähigkeit, selbst ohne Kenntnis der zugrunde liegenden biologischen, biochemischen und fluiddynamischen Zusammenhänge.

### 3.4.1 Vergleich mechanischer Eigenschaften und NIR-Reflexion

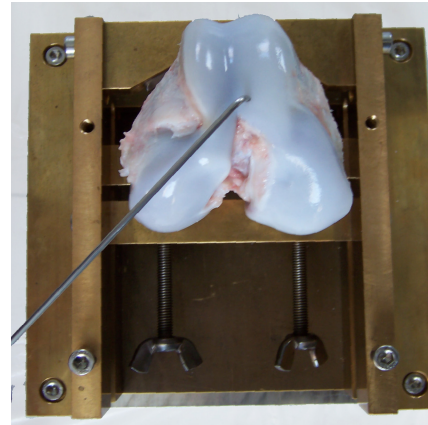
Härte ist definiert als der mechanische Widerstand, den ein Körper dem Eindringen eines anderen Körpers entgegensetzt. Für Knorpel ist sie ein wichtiges Kriterium zur Diagnose von Knorpelschäden (vgl. Kap. 2.2.3) und wird während Arthroskopien durch Tasten geschätzt. Um objektivere Messgrößen zu erhalten, wurde mittels einer Materialprüfmaschine der mechanische Widerstand von Knorpel bestimmt und untersucht, ob sich über eine Kalibration dieser Widerstand aus der NIR-Reflexion vorhersagen lässt.

Als Modell diente, wegen der leichten Verfügbarkeit über einen längeren Zeitraum, porkiner Gelenkknorpel der femuralen Kondylen von ca. 8 Wochen alten Schlachtschweinen mit unterschiedlich stark ausgeprägter Arthrose. Der Knorpel wurde an festgelegten Stellen (vgl. Abb.3.12(c) und 3.12(d)) spektral untersucht und anschließend seine Festigkeit mittels der Prüfmaschine an diesen Stellen festgestellt. Aus dem gewonnenen Datensatz abhängiger und unabhängiger Variablen wurden Kalibrationsmodelle entwickelt und überprüft. Es wurden 11 Explantate untersucht, die aus dem Kniegelenk mit geschlossener Gelenkkapsel sowie Teilen des Femurs, der Tibia und der Fibula bestanden. Sie wurden bei 8 °C gelagert und zwischen acht und 30 Stunden post mortem untersucht. Unmittelbar vor der Messung wurde das weiche Gewebe entfernt und der Femur so gekürzt, dass die Probe in einer speziell

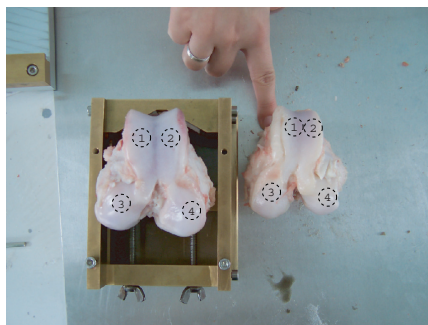
entwickelten Haltevorrichtung (Abb. 3.13) eingespannt werden konnte. Die Haltevorrichtung erlaubt das Einspannen unter verschiedenen Winkeln und ist so gelagert, dass eine Verschiebung in  $x$ - und  $y$ -Richtung möglich ist.



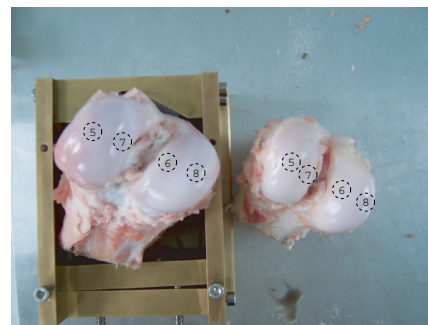
(a) Prinzip Haltevorrichtung [110]



(b) Haltevorrichtung mit femoralen Kondylen eines porkinen Kniegelenks und Sonde



(c) Messpunkte 1 und 2 auf der Patellaoberfläche, 3 bis 4 auf den Kondylen



(d) Messpunkte 5 bis 8 auf den Kondylen

**Abb. 3.12:** Haltevorrichtung und Messstellen für den Vergleich mechanischer und optischer Eigenschaften von porkinem Knorpel

Im ersten Schritt wurde die Probe am Femur fixiert und, nach Messung des 40 % Reflexionsstandards, von den Messpunkten ein bis vier Spektren aufgenommen. Dazu wurde die Sonde unter leichtem Druck plan auf die Knorpeloberfläche platziert und ca. 10 Einzelspektren mit einer Integrationszeit von 1 ms aufgenommen. Anschließend wurde die Haltevorrichtung mit Probe auf dem Messgerät (Texture Analyser TA-XT2i, Winopal Forschungsbe-

darf GmbH, Abb. 3.13) fixiert und die gleichen Messstellen untersucht. Der TA-XT2i ist eine Materialprüfmaschine für die Druck- und Zugmessung mit Linearachse und Kraftmessdose (vgl. [3]) und einer kugelförmigen Messspitze mit 1,5 mm Durchmesser. Die Probe wurde so fixiert und positioniert, dass die Bewegungsrichtung der Messspitze annähernd radial zur Oberfläche verlief. Die Messspitze wurde auf die Knorpeloberfläche verfahren und, nach Kontakt, weitere 0,8 mm in den Knorpel gedrückt. Zur Charakterisierung des mechanischen Widerstands wurde die Kraft gemessen, die als Reaktion auf die Verformung des Knorpels an der Messdose des Texture Analysers anlag. Als Kontaktkraft wurde ein Widerstand von 0,1 N definiert, die Geschwindigkeit der Messspitze war auf 0,1 mm/s eingestellt, und es wurden 5 Messwerte pro Sekunde aufgenommen. Nach Messung der Punkte 1 bis 4 wurde die Probe umgelagert (vgl. Abb. 3.12(d)) und die optischen und mechanischen Messungen analog an den Messpunkten 5 bis 8 wiederholt. Es konnte keine Befundung analog zu arthroskopischen Untersuchungen durchgeführt werden, da über den gesamten Versuchszeitraum kein erfahrener Arthroskoper zur Verfügung stand, offensichtliche Knorpelschäden wurden jedoch protokolliert.

Jede Messung lieferte ca. 40 Kraft-Weg-Datenpaare, wobei die Kraft mit dem Weg annähernd quadratisch zunahm. Teilweise wurde bei Eindringtiefen über 0,6 mm die Tangentialschicht des Knorpels durchstoßen, was deutlich in den Kraft-Weg-Diagrammen zu sehen war. Um eine Vergleichbarkeit der Messungen zu gewährleisten, wurden deshalb nur Werte bei geringeren Eindringtiefen weiter untersucht.

Zur Reduzierung der Messwerte wurden die Kraft-Weg-Messpaare (vgl. Abb. 3.14) durch ein Polynom zweiten Grades

$$y = a_0 + a_1x + a_2x^2 \quad (3.1)$$

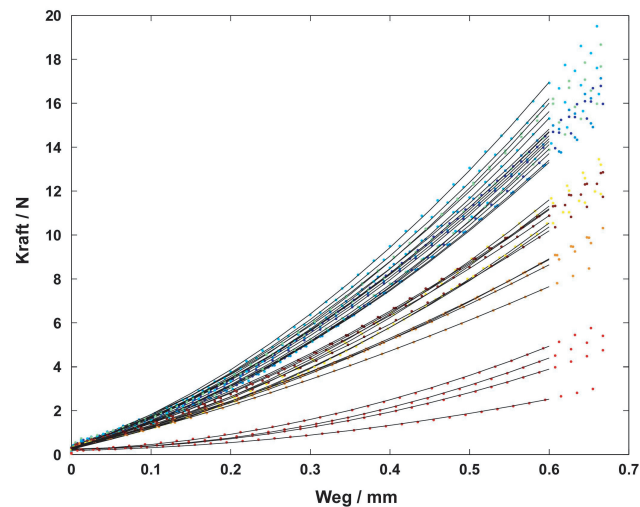
approximiert und die beiden Koeffizienten  $a_1$  und  $a_2$  als Kenngrößen für den



**Abb. 3.13:** Versuchsaufbau zur Untersuchung des mechanischen Widerstandes von Gelenkknorpel mit Texture Analyser TA-XT2i, Haltevorrichtung und porkinem Kniegelenk

mechanischen Widerstand verwendet.

Aus den Einzelspektren jedes Messpunktes wurden Mittelwertspektren berechnet, daraus das Absorptionsspektrum und, als Offset-Korrektur, die erste Ableitung gebildet. Die Koeffizienten und die verarbeiteten Spektren der Messpunkte bildeten den Datensatz zur Bestimmung verschiedener Kalibrationsmodelle (SLR, MLR und PLS) und für interne oder externe Validierungen.



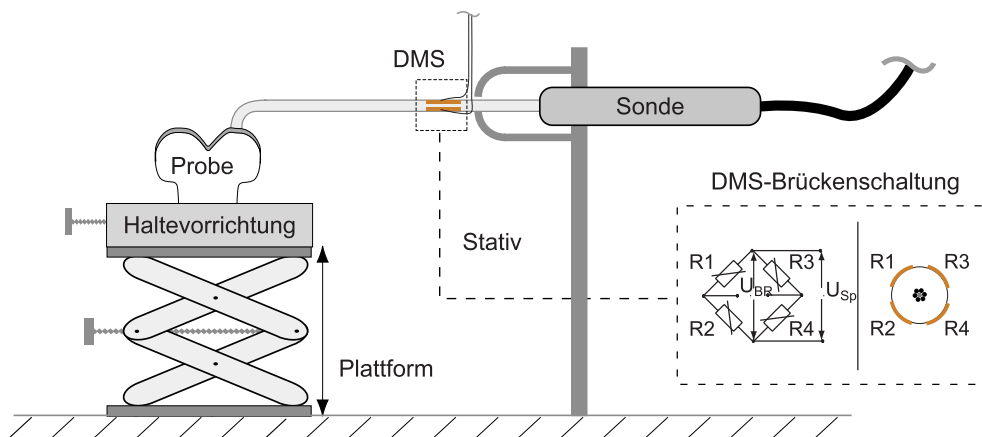
**Abb. 3.14:** Kraft-Weg-Diagramm mehrerer Messungen von Gelenkknorpel mit Messpunkten und quadratischer Interpolation

### 3.4.2 NIR-Reflexion unter Druckbelastung

Knorpel als viskoelastisches Material kann unter Druckbelastung sowohl seine Form als auch seine Zusammensetzung ändern (vgl. Kap. 2.2.1). Da die Sonde des Messsystems sowohl zum Palpieren als auch zur optischen Untersuchung mit leichtem Druck auf die Knorpeloberfläche aufgesetzt wird, könnte sich das Messsignal auch in Folge des Drucks ändern.

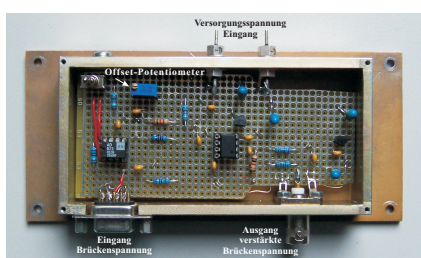
Zur Untersuchung dieses Zusammenhangs wurde ein Messaufbau (vgl. Abb. 3.15) zur gleichzeitigen Aufnahme der Absorption des Knorpels und des Druckes, den die Sonde auf die Knorpeloberfläche ausübt, verwendet. Die Sonde wurde mit einem Stativ so fixiert, dass die Kontaktfläche der Sonde senkrecht über einer höhenverstellbaren Plattform positioniert war. Darauf konnte die Haltevorrichtung angebracht und mit ihr Knorpel gegen die Sonde verschoben werden. Dadurch war es möglich, durch die Verschiebung einen variablen Druck zwischen Sonde und Knorpeloberfläche einzustellen.

Da eine direkte Kraftmessung zwischen Sonde und Knorpeloberfläche, z. B. durch Piezosensoren, nicht möglich ist, wurde stattdessen die Verformung der



**Abb. 3.15:** Schema des Versuchsaufbaus zur zur gleichzeitigen Messung der Anpresskraft mittels DMS-Brückenschaltung und der NIR-Reflexion

Sonde durch das Biegemoment bestimmt. Für die Messung der resultierenden Dehnung bzw. Stauchung wurden auf der Oberfläche der Sonde 4 Dehnmessstreifen (DMS) in Vollbrückenverschaltung verklebt (vgl. Abb. 3.16(b)). Die durch Verformung hervorgerufene Brückenspannung erreichte nur Werte nahe 1 mV, so dass ein speziell angefertigter Messverstärker (Abb. 3.16(a), [40]) vor die eigentliche Signalerfassung geschaltet wurde. Die Ausgangsspannung des Verstärkers wurde über ein digitales Speicheroszilloskop (54624A, Agilent Technologies) visualisiert und mit 8 Bit Auflösung digitalisiert.



(a) Geöffneter DMS-Vorverstärker

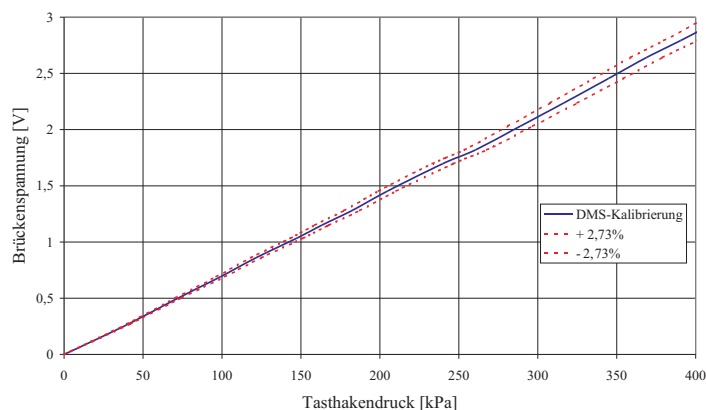


(b) Position der DMS auf der Sonde

**Abb. 3.16:** Messverstärker und Sonde mit DMS

Zur Kalibrierung der DMS-Schaltung wurde anstelle einer Probe eine elektrische Präzisionswaage (Kern und Sohn GmbH) auf der Plattform angebracht und durch Verschieben der Plattform die Kraft zwischen Waage und Sonde

variiert. Aus dem angezeigten Gewicht wurde die Kraft auf die Sondenspitze bestimmt, woraus sich auch der Druck auf den Knorpel bei Vollkontakt mit der Sondenspitze bestimmen ließ. Abb. 3.17 zeigt den linearen Verlauf des Zusammenhangs zwischen Brückenspannung und Druck.



**Abb. 3.17:** Streudiagramm und Kalibration zwischen Spannung und Druck des DMS-Aufbaus mit der ermittelten Messunsicherheit von 2,73 %

Um auszuschließen, dass die Biegung der Sonde alleine zu Signalveränderungen z. B. durch Variation des Biegungsradius der Fasern führt, wurde eine Vergleichsmessung mit einer optisch gleichbleibenden Referenz (optische Haftpaste) durchgeführt. Dazu wurde die Austrittsfläche der Lichtleitfasern verschlossen und die Sonde in einem Bereich gebogen, der einer Druckkraft auf die Sondenfläche von 5 N entsprach. Die maximale Signalschwankung über den gesamten Spektralbereich war 0,01 AU, was etwa 0,2 % der Maximalamplitude entspricht und der Größe des Systemrauschen des Spektrometers entspricht.

Als Tiermodell kam ebenfalls porkiner Gelenkknorpel von Schlachtschweinen zum Einsatz, der analog der in Kap. 3.4.1 beschriebenen Vorgehensweise vorbereitet wurde. Die Proben wurden am Femur in der Haltvorrichtung fixiert und mit dieser auf der Plattform so positioniert, dass die Sondenspitze möglichst radial zur Oberfläche auflag. Nach Referenzierung des Spektrome-



tersystems mit einem 40 % Reflexionsstandard wurde die Plattform soweit verfahren bis eine Maximalkraft von 5 N anlag, was einem Oberflächendruck von 0,2 MPa entspricht. Die Andruckkraft (ersichtlich über die Spannungsanzeige des Oszilloskops) wurde in Schritten von ca. 0,3 N in einem Intervall von ca. 1 s reduziert, wobei synchron alle 100 ms Spannung und Spektren aufgezeichnet wurden. Die kompletten Absorptionsspektren oder ihr Maximalwert bei 1480 nm bildeten zusammen mit den Spannungswerten die Datenbasis für Kalibrationsmodelle und Validierungsschritte.

## 4. ERGEBNISSE

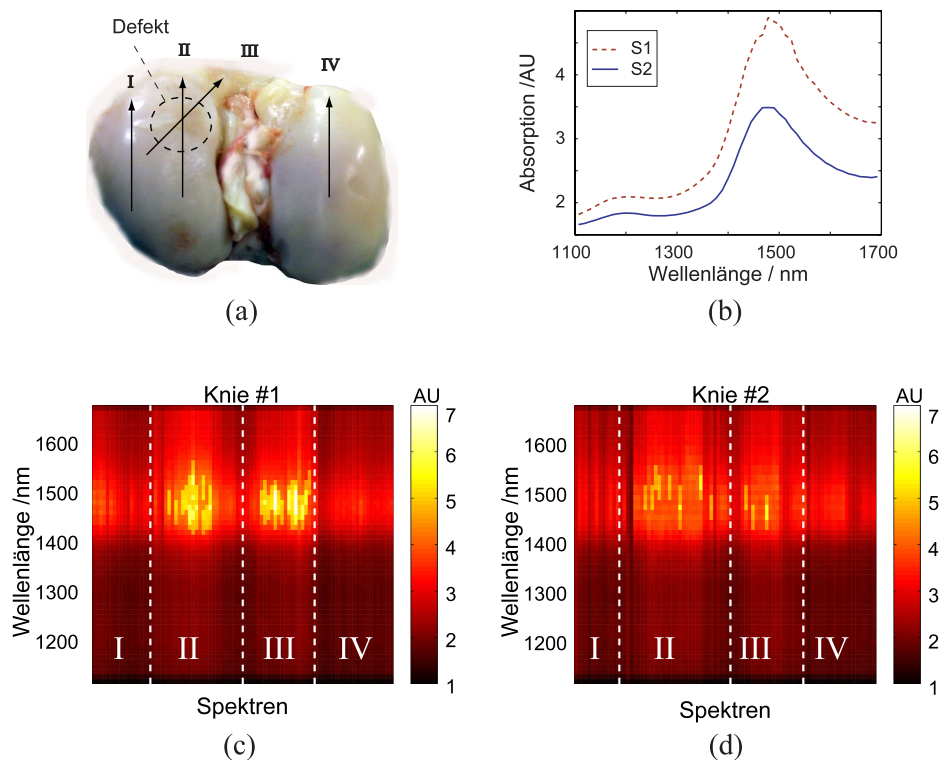
### 4.1 Vorversuche

#### 4.1.1 Machbarkeitsabschätzung

Anhand von deutlichen Knorpelschäden an parkinen Knien wurde die grundsätzliche Eignung des Verfahrens untersucht und eine geeigneten Vorgehensweise für den klinischen Einsatz des Messsystems entwickelt.

Im Ablauf des Experiments wurden aufeinander folgend Spektren von gesundem Knorpel und vom Übergang zwischen gesundem bis zu stark geschädigtem Knorpel aufgenommen (Abb. 4.1). Die typischen Kennzeichen eines Knorpelspektrums, wie sie in Abb. 4.1(b), dargestellt sind, sind auch in den Verläufen der beiden untersuchten Kniegelenke (Abb. 4.1(c) und (d)) zu erkennen: Maxima bei ca. 1.225 nm und 1.480 nm und relative Minima bei 1.300 nm und 1.680 nm. Während diese Strukturen in den Referenzbahnen (I und IV) weitgehend unverändert bleiben, steigt die Absorption um 1.480 nm entsprechend der Zunahme des Knorpelschadens an und verringert sich bei Abnahme des Schadens wieder.

Eine Erhöhung der Absorption in diesem Wellenlängenbereich (entspricht einer Formveränderung des Spektrums) deutet auf eine veränderte chemische Zusammensetzung des Knorpels im Bereich des Schadens hin. Da in diesem Bereich sowohl die ersten Obertöne von  $OH$ - und  $NH$ -Gruppen als auch der erste Oberton der  $CH$ -Kombinationen zu finden sind, kann ohne Referenzanalysen nicht auf die chemische Ursache der Veränderung geschlossen werden. Eine mögliche Ursache ist die Zunahme des Wassergehalts bei



**Abb. 4.1:** Veränderung der Absorption in Abhängigkeit der Lokalisation und Schädigung am porcinen Femurkondylus. (a) Bahnen und Knorpelschaden; (b) Absorptionsspektren von geschädigtem (S1) und gesundem Knorpel (S2); (c) und (d) Absorptionsspektren entlang der Bahnen

anfänglichen und der leichtere Austritt von Wasser unter Druck bei fortgeschrittenen Knorpelschäden.

Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass sich gesunder und geschädigter Knorpel optisch im NIR unterscheiden. Des Weiteren wurde die Absorptionsbande um 1.480 nm als signalgebend bewertet. Die kontakthafte Messung mit den beschriebenen Parametern wurde für die weiteren Messungen als Standard festgelegt.

### 4.1.2 UV-VIS-Spektroskopie

Untersucht wurden die Absorptionseigenschaften und die Autofluoreszenz von equinem Knorpelgewebe und Kollagen Typ II mit der Fragestellung, ob die optischen Eigenschaften im leichter zugänglichen UV-VIS-Bereich die Ergebnisse der NIR-Spektroskopie ergänzen können.

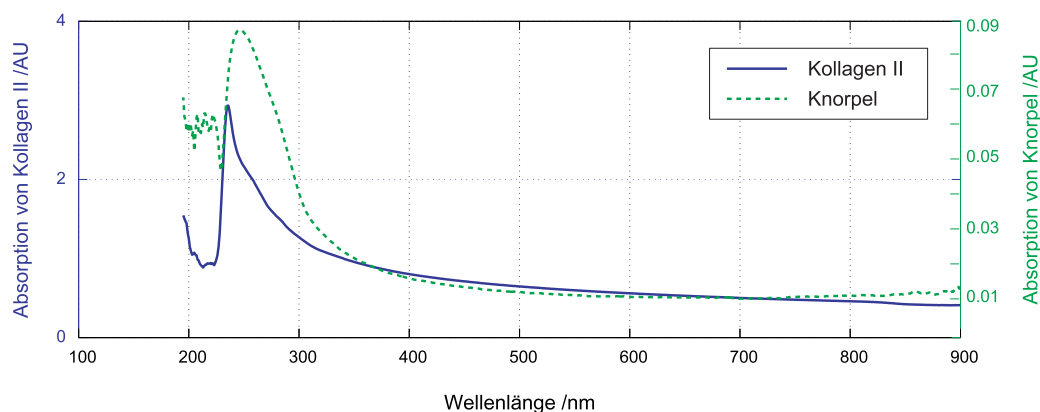
#### Absorption im UV-VIS

Die Absorption des in Essigsäure suspendierten Knorpels lag zwischen 0,01 AU und 0,085 AU, die von Kollagen II zwischen 0,08 AU und 0,85 AU. Der Unterschied in der Amplitude ist durch die unterschiedliche optische Dichte der Proben zu erklären, Kollagen II ist in Essigsäure löslich, während sich die Suspension der Knorpelflocken schnell getrennt hat.

Die Absorptionsspektren von Knorpel und Kollagen II (Abb. 4.2) zeigen im sichtbaren Bereich eine geringe aber gleichmäßige Absorption, was der fast weißen Farbe beider Stoffe entspricht. Im unteren Bereich des NIR (700 nm bis 900 nm) zeigen sich leichte Unterschiede. Im UV sind dagegen deutliche Banden (Maxima bei 235 nm bzw. 245 nm für Kollagen II bzw. Knorpel) zu erkennen. Beide Banden zeigen an der linken Flanke das gleiche steile Anstiegsverhalten, unterscheiden sich jedoch danach in ihrer Form auf der rechten Flanke deutlich. Zusätzlich zeigt Knorpel auch in einem energiereichen Teil des UV (ca. 210 nm bis 230 nm) Absorption, in dem Kollagen II kaum absorbiert.

Der Unterschied in der Höhe der Absorption beider Spektren liegt darin begründet, dass Kollagen II in Essigsäure löslich ist, während Knorpel nur in Suspension gebracht werden kann, so dass ähnliche optische Dichten nur sehr schwer herzustellen sind. Für die unterschiedlichen Formen sind verschiedene Erklärungen möglich:

1. Der Unterschied im NIR deutet auf einen unterschiedlichen Stickstoff-



**Abb. 4.2:** Absorptionsspektren von hyalinem Knorpel und Kollagen II im UV/VIS/NIR

gehalt (3.  $-NH$ -Oberton) hin.

2. Ist in beiden Fällen Kollagen II der einzige Absorber (beide Spektren müssten die gleiche Form haben), kann daraus geschlossen werden, dass durch den Reinigungsprozess die optischen Eigenschaften des Kollagens II verändert wurden.
3. Sind die optischen Eigenschaften des Kollagens II weitgehend erhalten geblieben, folgen die Unterschiede in der Form der Spektren aus den zusätzlichen chemischen Komponenten des Knorpels (Knorpelspektrum als Summe von Kollagenspektrum und Spektren weiterer Komponenten). Die gleiche Lage und Steigung der linken Seite der Bande im UV deutet darauf hin, dass hier fast ausschließlich Kollagen II absorbiert, während bei Knorpel bei höheren Wellenlängen auch andere Stoffe zum Signal beitragen.
4. Der parallele Anstieg der Absorption unterhalb 200 nm bei beiden Proben deutet darauf hin, dass hier die gleichen chemischen Substanzen im Knorpel und Kollagen absorbieren.

Eine umfassende Erklärung der Unterschiede der Absorption von Kollagen II und Gelenkknorpel ist ohne Referenzmessungen und aus diesem Einzelexperiment nicht möglich. Der Vergleich der Absorptionsspektren legt jedoch den

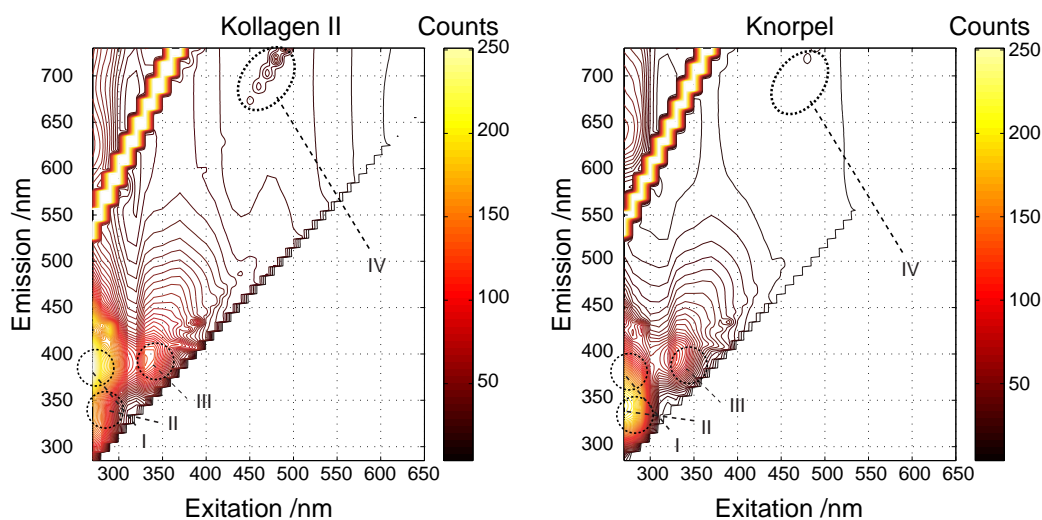
Schluss nahe, dass sich im UV der Gehalt von Kollagen II im Knorpelgewebe quantitativ bestimmen ließe, wobei sich das Verhältnis der Absorption bei 235 nm (Kollagen II und Knorpel) zur Absorption bei 245 nm (nur Absorption Knorpel) als vielversprechend anbieten würde. Auch bei der Kultivierung von Knorpelzellen wäre damit eine Überwachung der Spezialisierung von Stammzellen und der Kollagenogenese möglich. Gegen den in vivo Einsatz spricht, dass Strahlung in diesem Wellenlängenbereich (UV-C, 200 nm bis 280 nm) wegen ihrer stark schädigenden Wirkung auf Proteine und Nukleinsäure biologisch bedenklich ist.

### Autofluoreszenz

Das Fluoreszenzmaximum lag bei Kollagen II bei ca. 230 Counts und bei Knorpel bei ca. 170 Counts am Detektor. Sowohl Knorpel als auch Kollagen II zeigten Regionen mit Autofluoreszenz (vgl. I-IV in Abb. 4.3). Von den markierten vier Regionen konnte der Fluorophor bei 275 nm/395 nm (I) als Pyridinoline identifiziert werden [108], ein nicht reduzierbarer Cross-Link zwischen Kollagenen. Ähnlich handelt es sich bei 295 nm/335 nm (II) um das Protein-Cross-Link Pentosidine [108]. Pyridinoline zeigt bei Knorpel ein deutlich stärkeres Signal als Pentosidine, welches bei Kollagen II deutlicher fluoresziert. Der Fluorophor 340 nm/390 nm (III) zeigt eine etwas schwächere Fluoreszenz als I bzw. II und hat in beiden Proben in etwa die gleiche Signalstärke. Bei (450 nm - 500 nm)/(670 nm - 730 nm) (IV) erscheint im Unterschied zum Knorpel im Kollagen II eine leichte Fluoreszenz. Die Fluorophore für die Maxima III und IV konnten aus der Literatur nicht eindeutig identifiziert werden.

Die Unterschiede in den EEMs bei I, II und IV deuten darauf hin, dass ein Fluoreszenzaufbau möglich ist, mit dessen Hilfe Kollagen II im Knorpel selektiv gemessen werden kann. Davor muss jedoch geklärt werden, ob diese Unterschiede nicht durch die Isolierung des Kollagens II verursacht wur-

den. Zusätzlich lässt die geringe Photonenausbeute (wenige hundert Counts im Photomultiplier des Spektrometers) mit einer sehr geringen Signalstärke rechnen. Eine Bildgebung in vivo mittels Videokamera dürfte damit nicht möglich und der Einsatz optischer Fasern und einer kontaktierenden Messung, analog zum NIR-Messsystem, sehr verrauscht sein. Des Weiteren sind Anregungswellenlängen im UV-B (I) und UV-A (II) medizinisch problematisch.



**Abb. 4.3:** Niveauliniendarstellung der Excitation-Emissions-Matrizen von Kollagen Typ II und Knorpelgewebe mit vier Regionen mit Autofluoreszenz (I - IV)

Aus den durchgeführten Versuchen im UV-VIS ergeben sich interessante Ansatzpunkte für zukünftige Forschungen und Anwendungsentwicklungen, die sich jedoch eher für histologische Fragestellungen eignen. Für in vivo Anwendungen müsste zum Schutz des Gewebes mit sehr kleinen Strahlungsmengen gearbeitet werden, was ein kaum messbares Signal zur Folge hätte. Aus diesem Grund ist eine Integration in das beabsichtigte Messsystem nicht mit vertretbarem Aufwand möglich.

## 4.2 Verfahrensentwicklung

Die Ziele dieser Arbeitsschritte waren, das entwickelte Messsystem zu überprüfen und seine Aussagekraft hinsichtlich der Diagnose von Arthrose zu validieren. Dazu wurden anfangs Sicherheitsaspekte für den Einsatz im medizinischen Umfeld untersucht. Daran anschliessend wurde die Aussagekraft der gewonnenen Daten an Knorpelimplantaten überprüft und in einer Studie die NIR-Spektroskopie mit bekannten medizinischen Verfahren verglichen.

### 4.2.1 Systemsicherheit

Hinsichtlich der Überprüfung der Systemsicherheit für den Einsatz im klinischen Umfeld können folgende Aussagen getroffen werden:

**Konformität:** Das Gesamtsystem wurde in einem zertifizierten Prüflabor untersucht. Es wurden alle Prüfpunkte gemäß EN 60601-1-2:2001 (elektromagnetische Verträglichkeit) und EN 60601-1:1990+A1:1993+A2:1995+A13:1996 (Gerätesicherheit) erfüllt, womit das Messsystem auch der Medizinprodukterichtlinie 93/42/EWG entspricht.

**Biokompatibilität:** Die Sonde besteht ausschließlich aus Edelstahl, Quarzglas und einem Kunstharz. Es wurde vom Hersteller der Sonden (Loptec, Berlin) die Biokompatibilität aller verwendeten Materialien bestätigt.

**Elektrische Sicherheit:** Die Sonde ist ausschließlich über mit Kunststoff gemantelte Quarzglasfasern mit den elektrisch aktiven Systemkomponenten verbunden. Beide Materialien sind elektrisch nicht leitend. Eine zusätzliche galvanische Trennung wird über das Y-Verbindungsstück aus Kunststoff erreicht. Selbst bei einer Fehlfunktion des Spektrometersystems ist die Weiterleitung von Strom über die Sonde zum Bediener bzw. zum Patienten nicht möglich.



**Wärmeentwicklung:** Aus den Beleuchtungsfasern (ca.  $1\text{ mm}^2$  Gesamtfläche) tritt eine Lichtleistung von  $15\text{ mW}$  aus. Nimmt man eine geringe Eindringtiefe von ca.  $2\text{ mm}$  an, ergibt sich ein direkt bestrahltes Knorpelvolumen von ca.  $2\text{ mm}^3$ . Bei Umwandlung der gesamten Lichtenergie in Wärme (100 % Absorption) und Vernachlässigung der Konduktion ergibt sich eine maximale Temperaturerhöhung von  $1,8\text{ °C}$  pro Sekunde (mit  $c_{K\text{norpel}} \approx 4\text{ kJ/kg/K}$ ). Bei Messzeiten von unter einer Sekunde an einem Ort und zusätzlicher Kühlung durch die Spülflüssigkeit während der Arthroskopie ist eine Erwärmung über einen physiologisch vertretbaren Bereich nicht zu erwarten.

**Strahlenschutz:** Eine vergleichende Messung der eingesetzten Lichtquelle mit in der Arthroskopie üblichen Kaltlichtquellen (Zeiss Superlux 300 und Opticon Picostar) ergab, dass die thermische Energie der Strahlung der Lichtquelle mit  $15\text{ mW}$  nur einen Bruchteil der Lichtenergie von Arthroskopielichtquellen ( $560\text{ mW}$  bzw.  $945\text{ mW}$ ) beträgt. Allerdings übertrifft die Leistungsdichte an der Austrittsfläche ( $15\text{ mW/mm}^2$ ) die Schadensgrenze von  $2,5\text{ mW/mm}^2$  für die Hornhaut des Auges (Cornea) nach DIN EN 60825-1 für Licht im Bereich  $1.050\text{ nm}$  bis  $1.400\text{ nm}$ . Dieser Wert wird allerdings bereits bei einem Abstand der Sonde zum Auge von  $7\text{ mm}$  unterschritten, so dass bei normaler Anwendung keine Gefahr besteht. Der Grünanteil der Lichtquelle warnt zusätzlich davor, dass Strahlung austritt. Zum Schutz der Haut gibt die IEC TR 60825-9 für  $t < 10\text{ s}$  zwischen  $380\text{ nm}$  und  $3.000\text{ nm}$  folgenden Höchstwert für die Gesamtbestrahlung vor:  $H = 2 \cdot 10^4 \cdot t^{1/4}\text{ J/m}^2$ . Dieser Wert wird mit dem Messsystem nie überschritten. Außer bei direktem Kontakt der Messsonde mit der Cornea ist die Gefährdung durch die austretende Strahlung sehr gering.

**Infektionsgefahr:** Die Sonde inklusive Lichtleitfasern kann gereinigt und autoklaviert werden (Erhitzen auf  $121\text{ °C}$ ,  $1\text{ bar}$  Wasserdampfüberdruck,  $20\text{ min}$ ). Die Infektionsgefahr ist damit nicht höher als bei chirurgischen Instrumenten. Die Fasern haben eine Gesamtlänge von  $3\text{ m}$ , so dass Messsystem und Rechner außerhalb des sterilen Bereichs be-

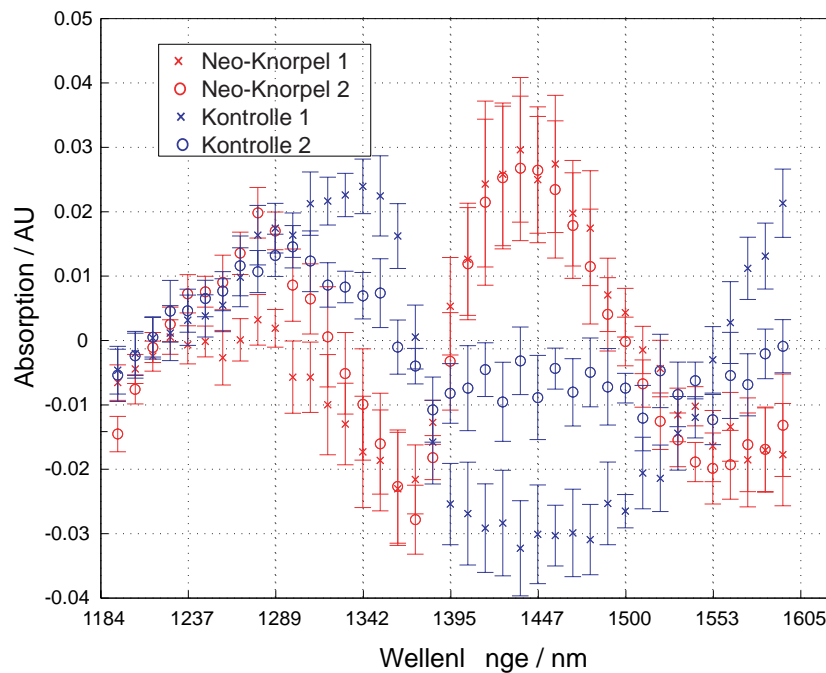
trieben werden können und den Patienten nicht gefährden.

Die Untersuchung der Systemsicherheit konnte sicherstellen, dass bei normalem Gebrauch des Messsystems eine Gefahr für Bediener und Patienten weitgehend ausgeschlossen werden kann. Wie bei allen medizinischen Instrumenten verbleibt ein Restrisiko, hier vor allem durch die Gefährdung des Auges bei direktem Kontakt mit der Sonde und der unbekanntem Langzeitwirkung von optischer Strahlung auf biologisches Gewebe, das unter natürlicher Umgebung keiner Exposition ausgesetzt ist.

#### 4.2.2 Untersuchung von Knorpelimplantaten

Da Neo-Knorpel auch nach einer längeren Verweildauer im Gelenk noch eine von nativem Knorpel unterschiedliche Zusammensetzung aufweist und sich gut vom umliegenden Gewebe unterscheiden lässt, konnte bei dieser Untersuchung das Messsystem unter fast klinischen Bedingungen getestet werden. Der Vergleich der Absorption von nativem Knorpelgewebe und gezüchtetem Neo-Knorpel (vgl. Abb. 4.4) zeigt einen annähernd gleichen Verlauf in den Regionen 1.180 nm bis 1.400 nm, während in der Region von 1.400 nm bis 1.550 nm der Neo-Knorpel deutlich mehr Licht absorbiert.

Histologische Untersuchungen ergaben, dass der Anteil von Proteoglykan in gesundem Knorpel bei 90 µg/mg bis 120 µg/mg und von Hydroxyprolin bei 90 µg/mg bis 110 µg/mg der entfetteten Trockensubstanz liegt. Der implantierte Neo-Knorpel zeigte dagegen eine Konzentration von 30 µg/mg bis 40 µg/mg Protoglykan und 30 µg/mg bis 45 µg/mg Hydroxyprolin [84]. Diese beiden Moleküle lassen auf den Vernetzungsgrad des Knorpels zurückschließen, wobei hohe Konzentrationen auf eine kompakte Matrix deuten, in der Wasser fest eingebunden ist. Eine geringer vernetzte Matrix kann sich leichter ausdehnen und dabei Wasser aufnehmen bzw. abgeben. Im unbelasteten Neo-Knorpel ist damit mit einem höheren Wasseranteil als im umgebenden



**Abb. 4.4:** Mittelwerte und Standardabweichungen der Reflexionsmessung von gesundem Knorpel und Neo-Knorpel

Knorpel zu rechnen, was sich mit der erhöhten Absorption in der Bande des ersten OH-Obertones deckt.

Es konnte damit gezeigt werden, dass sich Unterschiede in der chemischen Komposition von Knorpelgewebe über ihr NIR-Spektrum identifizieren lassen.

### 4.2.3 Untersuchungen am Schafsmodell

Frühe Stadien der Arthrose können bisher noch nicht eindeutig identifiziert werden. Daher kann man auch kein Referenzverfahren für frühe Stadien wählen, anhand dessen man eine NIR-Kalibration erstellen und testen könnte. Aus diesem Grund wurden in den NIR-Spektren von gesundem und leicht geschädigtem Knorpel nach möglichst aussagekräftigen Eigenschaften gesucht und diese mit medizinischen Methoden verglichen, die unterschiedliche

Aspekte der Arthrose untersuchen. Da keine absoluten Werte definiert werden können, kann dieser Vergleich nur über statistische Kenngrößen erfolgen.

### Datensatz

Von den 30 untersuchten Gelenkflächen zeigten 19 einen Befund in der Einteilung der ICRS, davon 11 mit Grad I, 6 mit Grad II und 2 mit Grad III. Befunde größer als Grad I wurden aus der statistischen Auswertung entfernt, da Befunde dieser Schwere auch leicht durch andere Methoden nachweisbar sind.

Die Lokalisation der Befunde beschränkte sich auf die Belastungszone des medialen Femurkondylus mit Schadensflächen von  $12,6 \text{ mm}^2$  bis  $105,6 \text{ mm}^2$ . Die als Maß für die optischen Eigenschaften verwendete mittlere Absorption (vgl. Kap. 3.3.2) verteilte sich kontinuierlich auf einen Bereich von 1,0 bis 2,3. Die Shorehärte nahm diskrete Werte von 100 (unelastisch) bis 51 an. Der Gesamtwassergehalt variierte von 55,8 % bis 77,7 %, der Glucosaminoglykangehalt von  $27,1 \mu\text{g}/\text{mg}$  bis  $86,6 \mu\text{g}/\text{mg}$  und der Kollagengehalt von  $108,7 \mu\text{g}/\text{mg}$  bis  $263,9 \mu\text{g}/\text{mg}$ . Das daraus berechnete Verhältnis hatte einen Wertebereich von 1,94 bis 6,63. Von den 12 möglichen Mankin-Scores zeigten sich nur die diskreten Werte 0 bis 3, die Knorpeldicke lag zwischen 0,66 mm und 1,01 mm.

In den folgenden Tabellen wurden für die Verfahren folgende Abkürzungen verwendet: *ICRS* für Schadensgrade nach dem ICRS-Protokoll, *a* für Defektfläche ( $\text{mm}^2$ ), *NIR* für mittlere Absorption im Band 1.410 nm bis 1.580 nm (AU), *S* für Shorehärte, *W* für Wassergehalt (Gewichtsprozent %), *G* für Glucosaminoglykangehalt ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), *K* für Kollagengehalt ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), *K/G* für das Verhältnis Kollagen- zu Glucosaminoglykangehalt, *M* für den Mankin-Score und *d* für die Knorpeldicke (mm).

### Korrelationsanalyse

Den Vergleich der verschiedenen Methoden über den Korrelationskoeffizienten zeigt Tab. 4.1. Die linearen Zusammenhänge, obwohl zum Teil signifikant, sind in keinem Fall stark genug, als dass zwei Verfahren gleichwertige Ergebnisse liefern würden. Es können jedoch Aussagen über die Verwandtschaftsverhältnisse einzelner Methoden getroffen werden.

**Tab. 4.1:** Matrix der Korrelationskoeffizienten  $r$ . \* Signifikanzniveau von 0,05, \*\* Signifikanzniveau von 0,01,  $a$  Defektfläche,  $NIR$  NIR-Absorption,  $S$  Shorehärte,  $W$  Wassergehalt,  $G$  Glucosaminoglykangehalt,  $K$  Kollagengehalt,  $K/G$  Verhältnis Kollagen- zu Glucosaminoglykangehalt,  $M$  Mankin-Score,  $d$  Knorpeldicke

	$a$	$NIR$	$S$	$W$	$G$	$K$	$K/G$	$M$	$d$
$a$	1	0,5 *	-0,63 **	0,56 **	0,46 *	-0,03	-0,43 *	0,63 **	-0,06
$NIR$		1	-0,66 **	0,59 **	0,07	-0,51 *	-0,51 *	0,67 **	-0,02
$S$			1	-0,49 *	-0,25	0,02	0,3	-0,9 **	-0,15
$W$				1	0,11	-0,37	-0,48	0,49	-0,28
$G$					1	0,41	-0,56 **	0,3	0,03
$K$						1	0,48 *	-0,01	0,03
$K/G$							1	-0,28	-0,12
$M$								1	-0,01
$d$									1

In dieser Versuchsreihe zeigt sich kein Zusammenhang zwischen Knorpeldicke und den anderen verwendeten Methoden. Der histologische Kennwert des

Mankin-Scores zeigt sehr deutliche Korrelationen zur Fläche und der NIR-Absorption und ist fast umgekehrt proportional zur Shorehärte, zeigt jedoch keine erkennbare Relation zur biochemischen Zusammensetzung. Biochemie und Histologie untersuchen offensichtlich unabhängige Aspekte der Arthrose.

Weder Glucosaminoglykangehalt, Kollagengehalt noch ihr Verhältnis korrelieren mit anderen Parametern außer der NIR-Absorption. Das trifft erstaunlicherweise auch nicht auf den Wassergehalt zu, obwohl sich ein Großteil des Knorpelvolumens aus diesen drei Bestandteilen zusammen setzt (vgl. Kap. 2.2.1).

Der Wassergehalt scheint unabhängig von Histologie und Biochemie, korreliert jedoch signifikant mit der Defektfläche, der Shorehärte und der NIR-Absorption.

Die NIR-Absorption zeigt signifikante Korrelationen sowohl mit Histologie, Teilen der Biochemie (Kollagengehalt und Verhältnis Glucosaminoglykan zu Kollagengehalt), dem Wassergehalt, der Shorehärte und der Defektfläche. Auch wenn der Korrelationskoeffizient nicht die Kausalität der getesteten Zusammenhänge anzeigen kann, ist die logische Verknüpfung der NIR-Absorption mit der Konzentration von Wasser und Biomolekülen naheliegend, da diese die in der betrachteten Bande signalgebenden  $-OH$ ,  $-NH$  und  $-CH$  Gruppen enthalten. Über welche kausalen Zusammenhänge die biomechanischen Eigenschaften oder die Defektgröße mit den optischen Eigenschaften des Knorpels zusammenhängen, kann aus dieser Untersuchung nicht abgeleitet werden. Die Korrelationsanalyse zeigt, dass sich verschiedene Aspekte der Pathologie des Knorpels in seinen optischen Eigenschaften widerspiegeln und mit dem eingesetzten Messsystem erfassen lassen.

### Klassifizierung und Varianzanalyse

Es sollte geklärt werden, inwieweit anhand der einzelnen Methoden eine Klassifizierung von gesundem und geschädigtem Knorpel vorgenommen werden kann. Dazu wurden die Daten entweder nach der ICRS-Einteilung oder dem Mankin-Score in die zwei Klassen (mit Befund, m. B. und ohne Befund, o. B.) eingeteilt. Nach ICRS wurde die Grenze zwischen Grad 0 und Grad I gelegt, beim Mankin-Score einmal zwischen 0 und 1 und einmal zwischen 1 und 2. In den Tabellen 4.2, 4.3 und 4.4 werden die sich daraus ergebenden Gruppen anhand ihrer Mittelwerte  $\bar{x}$ , Standardabweichung  $\sigma_x$  und Standardfehler  $\sigma_{\bar{x}}$  charakterisiert. Als Ergebnis werden die Signifikanzniveaus  $s$  der ANOVA dargestellt, sowie die aus den Ober- und Untergrenzen des 95 % Konfidenzintervalls  $Og$  und  $Ug$  resultierenden bedingten Wahrscheinlichkeiten der Spezifität  $Sp$  und der Sensitivität  $Se$ . Die Schadensfläche wurde in die Auswertung nicht mit aufgenommen, da nur bei Befund nach ICRS Werte für eine Schadensfläche vorliegen.

Nach Klassifizierung über den ICRS-Befund wurden gleich viele Proben (11) als ohne bzw. mit Befund klassifiziert. Für diese Klassen zeigen der Mankin-Score, die NIR-Messung, der Wassergehalt und die Shorehärte hoch signifikante Unterschiede (Signifikanzniveaus bei 0,01), das Verhältnis Kollagen- zu Glucosaminoglykangehalt noch einen einfach signifikanten Unterschied (Signifikanzniveau bei 0,05).

Alle hochsignifikanten Methoden zeigen eine höhere Sensitivität als Spezifität. Die NIR-Messung erkennt bei 100 % Sensitivität alle primären Knorpelschäden, teilt jedoch auch ca. 20 % der gesunden Knorpelproben fälschlicherweise dieser Kategorie zu (79 % Spezifität). Mankin-Score, Wassergehalt und Shorehärte zeigen ähnlich gute Spezifitäten, erkennen jedoch ca. 10 % ( $M$  und  $S$ ) bzw. 20 % ( $W$ ) der Proben mit Befund nicht. Das  $K/G$ -Verhältnis liefert mit einer Sensitivität von etwas über 50 % kaum noch klinisch relevante Aussagen.

**Tab. 4.2:** Vergleich der Methoden nach Klassifizierung über den ICRS-Befund (Grad 0: o.B. und Grad I: m.B.). *M* Mankin-Score, *NIR* NIR-Absorption, *W* Wassergehalt, *d* Knorpeldicke, *G* Glucosaminoglykangehalt, *K* Kollagengehalt, *K/G* Verhältnis Kollagen- zu Glucosaminoglykangehalt, *S* Shorehärte, *B* Befund, *o.B.* ohne Befund, *m.B.* mit Befund,  $\bar{x}$  Mittelwerte,  $\sigma_x$  Standardabweichung,  $\sigma_{\bar{x}}$  Standardfehler, *s* Signifikanzniveau, *Og* Obergrenze, *Ug* Untergrenze, *Sp* Spezifität, *Se* Sensitivität

	<i>B</i>	<i>N</i>	$\bar{x}$	$\sigma_x$	$\sigma_{\bar{x}}$	<i>Ug</i>	<i>Og</i>	<i>s</i>	<i>Sp</i>	<i>Se</i>
<i>M</i>	o.B.	11	0,5	0,7	0,2	0,0	0,9	0,002	0,77	0,89
	m.B.	11	1,9	1,1	0,3	1,2	2,7			
<i>NIR</i>	o.B.	11	1,5	0,2	0,1	1,3	1,7	0,000	0,79	1,00
	m.B.	11	2,1	0,1	0,0	2,1	2,2			
<i>W</i>	o.B.	11	65,9	5,5	1,7	62,2	69,6	0,003	0,75	0,80
	m.B.	11	72,7	3,7	1,1	70,3	75,2			
<i>d</i>	o.B.	11	0,8	0,1	0,0	0,8	0,9	0,700	0,67	0,56
	m.B.	11	0,9	0,1	0,0	0,8	0,9			
<i>G</i>	o.B.	11	45,7	18,9	5,7	33,1	58,4	0,316	0,70	0,67
	m.B.	11	53,2	14,8	4,5	43,2	63,1			
<i>K</i>	o.B.	11	187,8	50,7	15,3	153,8	221,9	0,201	0,63	0,57
	m.B.	11	159,3	50,6	15,3	125,3	193,3			
<i>K/G</i>	o.B.	11	4,5	1,5	0,4	3,5	5,5	0,015	0,80	0,75
	m.B.	11	3,1	0,9	0,3	2,5	3,6			
<i>S</i>	o.B.	11	87,4	8,6	2,6	81,6	93,2	0,000	0,83	0,90
	m.B.	11	66,5	13,6	4,1	57,3	75,6			

Werden nur Proben mit einem Mankin-Score von 0 als ohne Befund gewertet, zeigen nur noch 9 der 22 Proben keinen Befund. Dabei zeigen nur die Shorehärte und die NIR-Messung hochsignifikante und die Befundung nach ICRS signifikante Differenzen.

Im Vergleich zur ICRS-Einteilung steigt die Sensitivität der Shorehärte auf 100 %, die Spezifität sinkt leicht auf 75 %. Für die NIR-Messung sinken sowohl *Sp* als auch *Se* um ca. 20 Punkte auf 64 % bzw. 82 %. Durch arthroskopische Befundung werden in 82 % der Fälle die Proben mit Befund richtig zugeordnet, jedoch nur 64 % der Proben ohne Befund.



**Tab. 4.3:** Vergleich der Methoden nach Klassifizierung über den Mankin-Score (Score 0: o.B., Scores 1 bis 3: m.B.). *ICRS* ICRS-Grad, *NIR* NIR-Absorption, *W* Wassergehalt, *d* Knorpeldicke, *G* Glucosaminoglykangehalt, *K* Kollagengehalt, *K/G* Verhältnis Kollagen- zu Glucosaminoglykangehalt, *S* Shorehärte, *B* Befund, *o.B.* ohne Befund, *m.B.* mit Befund,  $\bar{x}$  Mittelwerte,  $\sigma_x$  Standardabweichung,  $\sigma_{\bar{x}}$  Standardfehler, *s* Signifikanzniveau, *Og* Obergrenze, *Ug* Untergrenze, *Sp* Spezifität, *Se* Sensitivität

	<i>B</i>	<i>N</i>	$\bar{x}$	$\sigma_x$	$\sigma_{\bar{x}}$	<i>Ug</i>	<i>Og</i>	<i>s</i>	<i>Sp</i>	<i>Se</i>
<i>ICRS</i>	o.B.	9	0,2	0,4	0,1	-0,1	0,6	0,030	0,64	0,82
	m.B.	13	0,7	0,5	0,1	0,4	1,0			
<i>NIR</i>	o.B.	9	1,6	0,3	0,1	1,3	1,8	0,008	0,64	0,82
	m.B.	13	2,0	0,3	0,1	1,8	2,2			
<i>W</i>	o.B.	9	67,5	6,2	2,1	62,7	72,2	0,224	0,67	0,77
	m.B.	13	70,6	5,4	1,5	67,3	73,8			
<i>d</i>	o.B.	9	0,9	0,1	0,0	0,8	1,0	0,821	0,57	0,67
	m.B.	13	0,9	0,1	0,0	0,8	0,9			
<i>G</i>	o.B.	9	45,9	17,3	5,8	32,6	59,2	0,423	0,50	0,67
	m.B.	13	51,9	17,0	4,7	41,7	62,2			
<i>K</i>	o.B.	9	169,7	57,0	19,0	125,9	213,6	0,780	0,44	0,62
	m.B.	13	176,2	49,6	13,8	146,2	206,2			
<i>K/G</i>	o.B.	9	3,9	1,3	0,4	2,8	4,9	0,720	0,40	0,59
	m.B.	13	3,7	1,5	0,4	2,8	4,6			
<i>S</i>	o.B.	9	90,4	3,8	1,3	87,5	93,3	0,000	0,75	1,00
	m.B.	13	67,5	13,2	3,7	59,6	75,5			

Setzt man hingegen die Grenze zwischen o.B. und m.B. bei einem Mankin-Score zwischen 1 und 2, erhöht sich entsprechend die Anzahl der Proben ohne Befund auf 13. Es ergeben sich hochsignifikante Unterschiede der Gruppen bei der Einteilung nach ICRS und, analog zur Einteilung nach ICRS, bei der NIR-Absorption, dem Wassergehalt und der Shorehärte sowie ein signifikanter Unterschied beim Kollagen-Glucosaminoglykan-Verhältnis.

Die Klassifizierung verbessert sich bei allen diesen Verfahren, wobei sie, außer bei der Shorehärte, höhere Spezifitäten als Sensitivitäten aufweisen. ICRS und NIR haben gleich hohe Werte von 91% (*Sp*) bzw. 73% (*Se*), über den

**Tab. 4.4:** Vergleich der Methoden nach Klassifizierung über den Mankin-Score (Scores 0 und 1: o.B., Scores 2 und 3: m.B.). *ICRS* ICRS-Grad, *NIR* NIR-Absorption, *W* Wassergehalt, *d* Knorpeldicke, *G* Glucosaminoglykangehalt, *K* Kollagengehalt, *K/G* Verhältnis Kollagen- zu Glucosaminoglykangehalt, *S* Shorehärte, *B* Befund, *o.B.* ohne Befund, *m.B.* mit Befund,  $\bar{x}$  Mittelwerte,  $\sigma_x$  Standardabweichung,  $\sigma_{\bar{x}}$  Standardfehler, *s* Signifikanzniveaus, *Og* Obergrenze, *Ug* Untergrenze, *Sp* Spezifität, *Se* Sensitivität

	<i>B</i>	<i>N</i>	$\bar{x}$	$\sigma_x$	$\sigma_{\bar{x}}$	<i>Ug</i>	<i>Og</i>	<i>s</i>	<i>Sp</i>	<i>Se</i>
<i>ICRS</i>	o.B.	13	0,2	0,4	0,1	0,0	0,5	0,001	0,91	0,73
	m.B.	9	0,9	0,3	0,1	0,6	1,1			
<i>NIR</i>	o.B.	13	1,6	0,3	0,1	1,4	1,8	0,001	0,91	0,73
	m.B.	9	2,1	0,2	0,1	2,0	2,2			
<i>W</i>	o.B.	13	66,8	5,6	1,6	63,3	70,2	0,009	0,75	0,60
	m.B.	9	73,0	3,7	1,2	70,1	75,8			
<i>d</i>	o.B.	13	0,8	0,1	0,0	0,8	0,9	0,606	0,80	0,47
	m.B.	9	0,9	0,1	0,0	0,8	0,9			
<i>G</i>	o.B.	13	43,8	15,1	4,2	34,7	52,9	0,056	0,80	0,58
	m.B.	9	57,7	16,9	5,6	44,7	70,7			
<i>K</i>	o.B.	13	175,3	51,9	14,4	143,9	206,7	0,853	0,50	0,38
	m.B.	9	171,0	54,0	18,0	129,5	212,6			
<i>K/G</i>	o.B.	13	4,2	1,5	0,4	3,4	5,1	0,029	0,78	0,54
	m.B.	9	3,1	1,0	0,3	2,3	3,8			
<i>S</i>	o.B.	13	88,1	7,8	2,2	83,3	92,8	0,000	0,87	1,00
	m.B.	9	60,8	6,1	2,0	56,1	65,4			

Wassergehalt erreicht man nur mäßig gute Klassifizierungen mit 75 % (*Sp*) bzw. 60 % (*Se*), während die Shorehärte mit 87 % Spezifität und 100 % Sensitivität ähnliche gute Werte erreicht wie die NIR-Messung bei Einteilung nach ICRS.

Die in der vergleichenden Untersuchung einbezogenen Verfahren untersuchen verschiedene Aspekte der Pathogenese der Arthrose. Auch wenn einzelne Methoden deutlich mit anderen korrelieren, liefert keine hinreichend gleichwertige Ergebnisse, dass eine Methode die andere vollständig ersetzen könnte.

In einer anderen Studie haben Kleemann et al. [49] ebenfalls mechanische

(Steifigkeit) und histologische (Mankin-Score) Methoden mit der Einteilung nach ICRS verglichen. Diese Autoren finden Korrelationskoeffizienten zwischen Mankin-Score und ICRS von  $r=0,74$ , zwischen Steifigkeit und ICRS von  $r=0,69$  und zwischen Mankin-Score und der Steifigkeit von  $r=0,49$ . Allerdings wurden bei dieser Untersuchung Schäden nach ICRS von Grad 0 bis 3 mit einbezogen, was die Unterschiede der Korrelation von Mankin-Score und Steifigkeit im Vergleich mit dieser Studie erklären könnte.

Es konnte gezeigt werden, dass der Mankin-Score und die Shorehärte einen starken Zusammenhang aufweisen, was sich sowohl in ihrer Korrelation als auch in den Klassifizierungsergebnissen der Shorehärte zeigt, wenn nach dem Mankin-Score gruppiert wird.

Weder Kollagen- noch Glucosaminoglykangehalt oder Knorpeldicke allein können zur Beurteilung von Knorpel herangezogen werden, während das Verhältnis von Kollagen zu Glucosaminoglykangehalt signifikante Aussagen zulässt.

Die Einstufung nach ICRS deckt sich gut mit dem Mankin-Score, klassifiziert jedoch nur mäßig gut zwischen Mankin-Score 0 und 1, besser jedoch, wenn die Grenze zwischen 1 und 2 gelegt wird.

Viele der von den medizinischen Methoden gemessenen Aspekte von Arthrose scheinen sich in den optischen Eigenschaften des Knorpels widerzuspiegeln, was die signifikanten Korrelationen mit der NIR-Absorption andeuten. Erstaunlicherweise ist die Korrelation mit Wasser nicht die deutlichste davon, auch wenn im gewählten Wellenlängenbereich eine Absorptionsbande des Wassers liegt. Bewertet man NIR-Spektroskopie daran, wie gut sie Knorpelschäden klassifizieren kann, zeigt sich, dass sie gleichwertige Ergebnisse liefert wie die besten Vergleichsverfahren.

## 4.3 Biomechanische Versuche

Die Funktion von Knorpel ist die Weiterleitung von mechanischer Energie, so dass sich pathologische Veränderungen auch in einer Veränderung seiner mechanischen Eigenschaften widerspiegeln. Deshalb wurden in einer speziellen Versuchsreihe die mechanischen Eigenschaften von Knorpel genauer charakterisiert und versucht, diese anhand von NIR-Spektren vorherzusagen. In einem weiteren Experiment wurde untersucht ob sich die optischen Eigenschaften von Knorpel schon durch den Druck während der Untersuchung verändern.

### 4.3.1 Vergleich mechanischer Eigenschaften und NIR-Reflexion

Die gemessene Gegenkraft beim Eindringen des Messkopfes in den Knorpel bis 0,6 mm variierte zwischen annähernd 0 N und 30 N. Das entspricht bei der Aufdruckfläche der Kugelspitze von 1,8 mm<sup>2</sup> einem Druckbereich von 0 MPa bis ca. 17 MPa, was in etwa der physiologischen Belastung von Knorpel entspricht (vgl. Kap. 2.2.1). Die aus den Kraft-Weg-Werten über eine quadratische Interpolation abgeleiteten Koeffizienten hatten einen Wertebereich von 0,5 bis 18 für den linearen Parameter  $a_1$  und von 5 bis 29 für den quadratischen Parameter  $a_2$ . Die maximale Absorption im Band 1.480 nm bis 1.510 nm nahm Werte von 1,5 AU bis 1,7 AU an.

Aus dem Datensatz von 88 Messungen an 10 Proben wurden verschiedene Kalibrierungsmodelle (SLR, MLR und PLS, vgl. Kap. 2.1.2) mit einem bis vier Regressionsfaktoren erstellt. Die Vorhersagegenauigkeit der einzelnen Modelle wurde für jeden Koeffizienten getrennt sowohl mit Kreuzvalidierung (KV) als auch Testsetvalidierung (TV) über den Korrelationskoeffizienten und den RMS bewertet. In Tab. 4.5 werden die Methoden gegenübergestellt.

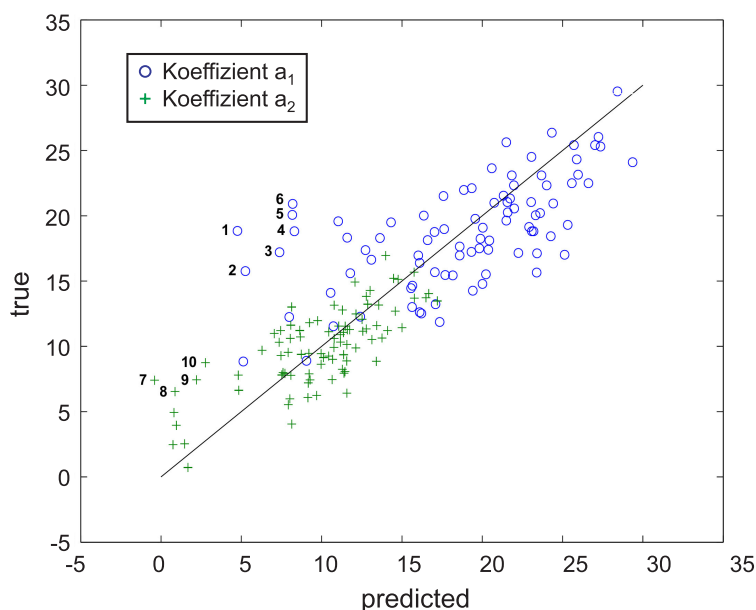
Schon aus der linearen Verknüpfung der Absorption einer Wellenlänge mit je-

**Tab. 4.5:** Vergleich verschiedener Kalibrationen (Modelle) zur Vorhersage der Koeffizienten  $a_1$  und  $a_2$  über den Korrelationskoeffizienten  $r$  und den RMS. \* Signifikanzniveau bei 0,05, *KV* Kreuzvalidierung, *TV* Testset Validierung, *SLR* simple linear regression, *MLR* multiple linear regression, *PLS* partial least square regression

Modell	Validierung	n Faktoren	r $a_1$	r $a_2$	RMS $a_1$	RMS $a_2$
SLR	KV	1	0,57*	0,66*	4,88	2,99
PLS	KV	2	0,2	0,55*	5,88	3,26
	KV	3	0,16	0,53*	6,06	3,32
	KV	4	0,26	0,56*	5,99	3,23
	TV	2	0,16	0,31	7,18	4,57
MLR	KV	2	0,61*	0,70*	4,62	2,78
	KV	3	0,63*	0,74*	4,53	2,63
	TV	2	0,67*	0,54*	4,9	3,96
	TV	3	0,72*	0,43*	4,37	4,31

weils einem Koeffizienten konnten Kalibrationen erstellt werden, die eine gute Vorhersage der beiden Parameter  $a_1$  und  $a_2$  ermöglichten. Die erstellten PLS-Modelle konnten Parameter  $a_1$  nur ungenügend vorhersagen,  $a_2$  hingegen mit einer ausreichend guten Linearität. Die MLR-Modelle zeigen durchgehend bessere Ergebnisse mit den größten Korrelationskoeffizienten und kleinsten Fehlern bei einer Regression auf drei Koeffizienten und einer internen Validierung. Durch dieses Modell konnten 81 % der Verteilung von  $a_1$  und 82,5 % von  $a_2$  erklärt werden.

In Abb. 4.5 sind die Vorhersagen eines MLR-Modells (3 Faktoren) dargestellt. Man erkennt einen deutlichen linearen Zusammenhang zwischen den gemessenen und mit dem Modell aus den Spektren berechneten Werten für  $a_1$  und  $a_2$ . Bei der Überprüfung möglicher Ausreißer wurde festgestellt, dass es sich bei den Proben 1-10 um Knorpelflächen handelt, die offensichtlich starke Schäden aufwiesen. Eine Erklärung dafür kann sein, dass der zur Kalibration verwendete Datensatz aus überwiegend offensichtlich gesundem Knorpel aufgebaut war.



**Abb. 4.5:** Streudiagramm der Kreuzvalidierung einer MLR-Kalibrationen für die Koeffizienten  $a_1$  und  $a_2$  mit 3 Faktoren (Wellenlängen) aus 88 Messungen. Proben 1-10 zeigten deutliche Knorpelschäden, während die anderen Knorpelflächen unauffällig waren.

Es war möglich, mit den erstellten Kalibrationen für die Koeffizienten eine signifikante Korrelation zwischen gemessenen und vorhergesagten Werten zu erreichen. Die Korrelationskoeffizienten liegen im gleichen Bereich wie der Korrelationskoeffizient zwischen Shorehärte und NIR-Absorption, wie er in Kap. 4.2.3 gefunden wurde. Im Gegensatz zum einfachen Wert der Shorehärte kann über die Bestimmung des linearen und quadratischen Anteils der nichtlinearen Antwort des Knorpels auf Druckbelastung der Knorpel wesentlich besser charakterisiert werden. Es ist jedoch noch nicht klar, inwieweit das nichtlineare Verhalten von Knorpel und seine möglichen Veränderungen durch Degeneration von diagnostischer Relevanz sind.

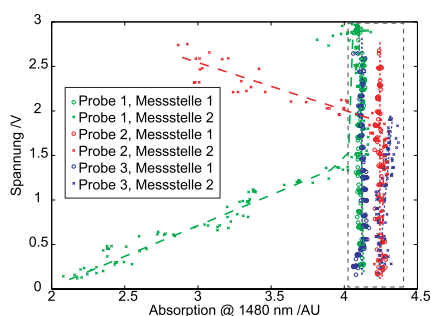
### 4.3.2 NIR-Reflexion unter Druckbelastung

Auf kurze Druckstöße reagiert Knorpel weitgehend elastisch, erst bei länger anhaltenden Belastungen ist ein Fließverhalten zu erkennen, das auch zu einer deutlichen Veränderung der chemischen Zusammensetzung führt (vgl. Kap. 2.2.1). Es galt zu klären, ob der Druck durch das Aufsetzen der Sonde während der Untersuchung zu messbaren Veränderungen der optischen Eigenschaften führt, oder ob der Knorpel während der Messung als optisch weitgehend konstant angesehen werden darf.

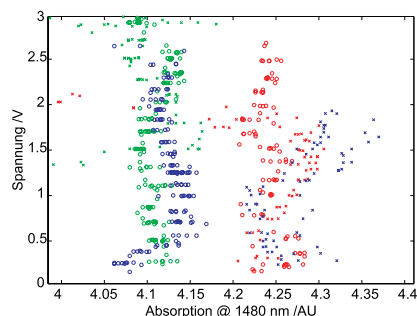
Dazu wurde Knorpel während einer optischen Messung mit definiertem Druck durch den Sondenkopf beaufschlagt und untersucht, ob sich dadurch eine Veränderung der Spektren beobachten lässt. Es wurde dabei die Aufdruckkraft im einem Bereich von 0,5 N bis 6 N variiert, was etwas über der Kraft bei normalem Palpieren (gemessen zwischen ca. 1 N und 4 N) hinausgeht.

Zur Verdeutlichung der Daten wurde als Kenngröße der Spektren die maximale Absorption bei 1.480 nm in der Abb. 4.6 verwendet. Bei der Versuchsdurchführung zeigte sich, dass ein vollständiger Kontakt der Sondenfläche mit der Knorpeloberfläche nicht immer gewährleistet war (vgl. Abb. 4.6(a) und 4.6(d)). Daraus resultierte eine Variation der maximalen Absorption über mehr als 2 AU. In den Untersuchungen hingegen, in denen dieser Effekt nicht auftrat (Abb. 4.6(b) und 4.6(c)), schwankte die Absorption vergleichsweise gering um ca. 0,1 AU (2,5 % der Amplitude). Ist das plane Aufliegen der Sondenspitze auf dem Knorpel nicht gegeben, führt das zu sehr deutlichen Veränderungen in Form und Amplitude der Spektren. Diese Veränderungen lassen sich durch einfache Algorithmen, z. B. durch das Festlegen eines Wertebereichs für gültige Messungen, automatisch identifizieren.

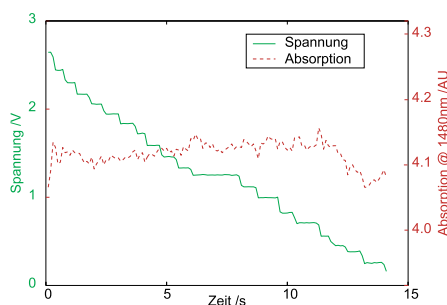
Für die weitere Auswertung wurden sechs Messungen von drei verschiedenen Kniegelenken in den Datensatz einbezogen, bei denen durchgehend Kontakt zwischen Sonde und Knorpelfläche bestanden hatte. Zwei Messungen mit Kontaktverlust wurden zur Verdeutlichung in Abb. 4.6(a) dargestellt.



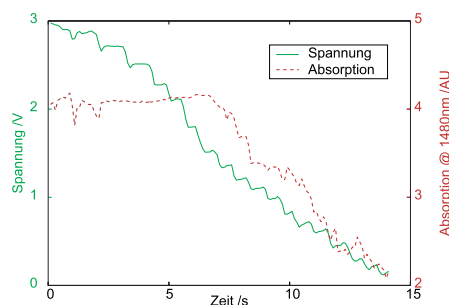
(a) Streudiagramm der DMS-Spannung und der Absorption. Bei der Messung der Probe 1, Messstelle 2 und Probe 2, Messstelle 2 kann man anhand der starken Veränderung der Absorption den Verlust des Kontakts zwischen Sonde und Knorpel erkennen



(b) Detail aus Abb. 4.6(a)



(c) Verlauf der DMS-Spannung und der Absorption ohne Kontaktverlust zwischen Sonde und Knorpel bei Probe 4, Messstelle 1



(d) Verlauf der DMS-Spannung und der Absorption mit Kontaktverlust nach ca. 7s zwischen Sonde und Knorpel bei Probe 2, Messstelle 2

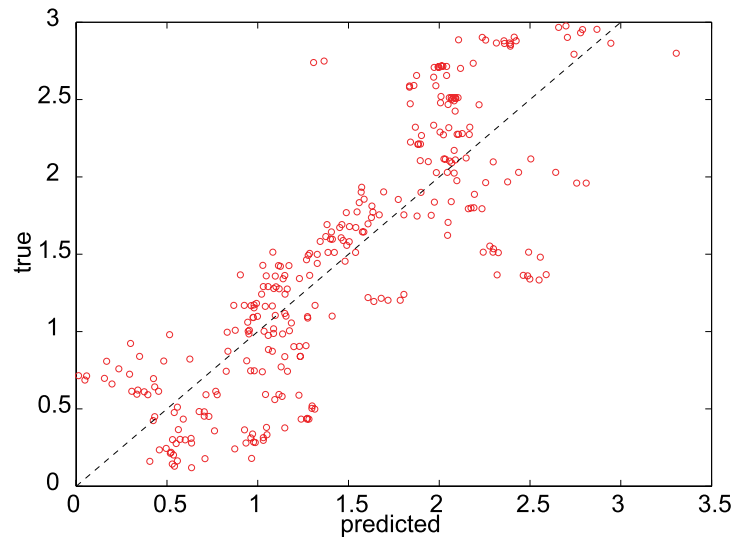
**Abb. 4.6:** Streudiagramme der DMS-Spannung und der Absorption bei 1.480 nm während der Reflexionsmessung mit unterschiedlichen Andruckkräften

Drei der fünf Messungen ohne Kontaktverlust mit insgesamt 308 Messpunkten wurden dem Trainingsdatensatz zugeordnet und es wurden verschiedene Modelle berechnet. Eine PLS-Kalibration mit fünf Faktoren (vgl. Abb. 4.7(a)) zeigte bei interner Validierung die beste Korrelation zwischen Vorhersage und gemessener Spannung aller getesteten Methoden mit einem signifikanten Korrelationskoeffizienten von 0,85 und einem RMSCV von 0,45 V. Wurden die Modelle dagegen mittels Testset aus den zwei Messungen validiert, die nicht im Trainingsdatensatz enthalten waren, zeigte sich, dass sogar

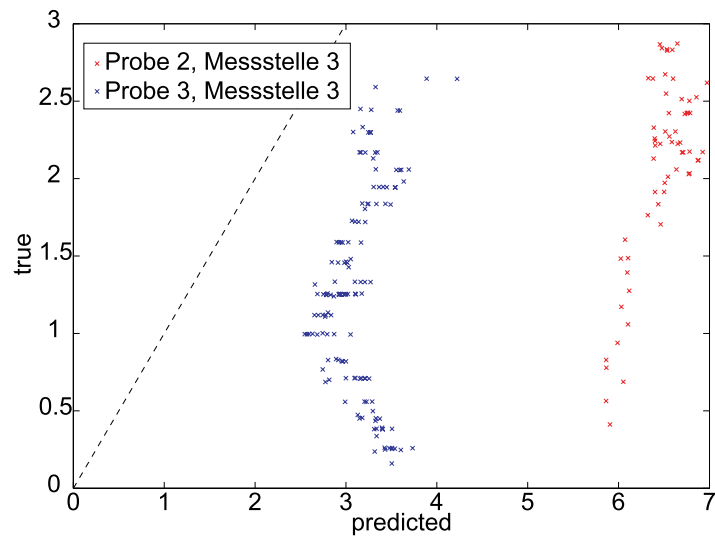


das beste Modell für die Vorhersage der Druckbelastung des Knorpels ungeeignet war (vgl. Abb. 4.7(b)). Der Korrelationskoeffizient der Messung von Probe 2 an der Messstelle 3 erreichte mit 0,76 zwar eine sinnvolle Größenordnung, der Fehler (RMSEP) von 1,9 V umfasst aber 63 % des Wertebereichs. Für die andere Messung ergab sich sogar nur ein  $r$  von 0,18 und ein RMSEP von 4,4 V.

Wie die Darstellung der Rohdaten schon nahelegte (vgl. Abb. 4.6), konnte, zumindest bei der relativ kurzen Belastung während der Versuche, kein Zusammenhang zwischen den optischen Eigenschaften und der Druckbelastung von Knorpel nachgewiesen werden. Ein deutlicher Einfluss der Andruckkraft bei der Untersuchung von Knorpelgewebe auf die Ergebnisse kann damit ausgeschlossen werden. Allerdings zeigte der Versuch auch, dass ein planes Aufliegen der Sondenfläche bei der Untersuchung unabdingbar ist.



(a) Interne Validierung der Brückenspannung eines PLS-Modells mit 5 Faktoren ( $r=0,85$ , RMSCV 0,45 V)



(b) Testsetvalidierung des PLS-Modells aus 4.7(a) durch zwei unabhängige Messungen. RMSEP=1,9 V und  $r=0,76$  (Probe 2, MS 2), RMSEP=4,4 V und  $r=0,18$  (Probe 3, MS 2)

**Abb. 4.7:** Streudiagramme einer Kreuz- und einer Testsetvalidierung zur Vorhersage der DMS-Spannung aus der Reflexionsmessung

## 5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Arthrotische Erkrankungen sind eine große Belastung sowohl für die betroffenen Patienten als auch für das Gesundheitssystem und die Volkswirtschaft. Auch wenn die Forschungsanstrengungen zur Pathogenese, Diagnose und Therapie der Arthrose in den letzten Jahren gesteigert wurden, ist ein vollständiges Modell der Arthrose nach wie vor nicht vorhanden. Aus diesem Grund ist es bisher auch nicht möglich, primäre Stadien der Arthrose sicher zu erkennen [102]. Die Diagnose von primären Knorpelschäden ist jedoch von großer Bedeutung bei der Wahl der Therapie, der Überprüfung des Therapieverlaufs und bei der Entwicklung neuer Therapieformen. Bisherige Verfahren können diese Schäden nur schlecht oder zerstörend nach Biopsien darstellen, weshalb der behandelnde Arzt während der Arthroskopie vor allem auf seine Erfahrung angewiesen ist.

In dieser Arbeit wurde die Entwicklung und Erprobung eines Messsystems vorgestellt, das es dem Arzt ermöglicht, während einer Arthroskopie objektive Messwerte über den Knorpelstatus zu erhalten, ohne dabei den Knorpel zerstören zu müssen. Dieses System, basierend auf der nahen Infrarotspektroskopie, ist in seiner Art neu und einzigartig.

Bei der Entwicklung des Systems wurde darauf geachtet, dass es im medizinischen Umfeld eingesetzt werden kann, den Arzt während der Arthroskopie möglichst wenig behindert und die Operationszeit nicht verlängert. Sowohl das Spektrometersystem als auch die Sonde, mit der Reflexionsspektren in vivo aufgenommen werden können, wurden in Hinblick auf Robust-

heit, einfachen Aufbau, schnelle Messwerterfassung, optimale Datenerfassung und größtmögliche Wirtschaftlichkeit entworfen. Es besteht aus einem Spektrometersystem, das alle elektrisch aktiven Komponenten beherbergt, einer austauschbaren, sterilisierbaren faseroptischen Sonde in Form eines medizinischen Tasthakens und Softwarekomponenten für die Steuerung des Systems und die Datenauswertung. Durch eine Risikoanalyse des Gesamtsystems konnte die weitgehende Unbedenklichkeit des Einsatzes auch im klinischen Umfeld dargestellt werden. Bei der Entwicklung wurden hauptsächlich Komponenten gewählt, die in einem auf dem Markt durchsetzbaren wirtschaftlichen Kostenrahmen lagen und bei Serienfertigung weitere Kostensenkungen ermöglichen. Dadurch wird sichergestellt, dass bei weiterer positiver Evaluierung auch ein Einsatz im klinischen Alltag möglich ist.

In den beschriebenen Vorversuchen konnte der Nachweis geführt werden, dass sich die Veränderung des Knorpelgewebes durch Arthrose in den optischen Eigenschaften widerspiegelt. Durch einen Vergleich der Reflexion von nativem und durch Tissue Engineering erzeugtem Neo-Knorpel konnte gezeigt werden, dass sich die unterschiedliche Zusammensetzung von nativem und gezüchtetem Knorpel auch in seinen Spektren unterscheiden lässt. Zusätzlich wurden Teilaspekte der Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften im UV-VIS-Bereich von Knorpel und Kollagen II untersucht. Es zeigten sich interessante Unterschiede zwischen den beiden Proben, doch lagen die Effekte im UV-Bereich oder zeigten nur eine geringe Signalstärke, so dass sie in diese Entwicklung nicht mit einbezogen wurden.

Zur Validierung des Messsystems wurde eine vergleichende Studie durchgeführt, bei der die Messung der optischen Eigenschaften von gesundem und primär geschädigtem Knorpel mit etablierten medizinischen Verfahren zur Arthrosediagnostik verglichen wurden. Dazu wurden die Knorpelflächen sowohl nach der arthroskopischen Klassifizierung nach dem ICRS-Standard untersucht, als auch biomechanischen, biochemischen und histologischen Untersuchungen unterzogen. Durch eine Korrelations- und eine Varianzanalyse konnte gezeigt werden, dass durch die optische Messung der Knorpelstatus ebenso gut eingeschätzt werden konnte wie mit den besten alternativen Methoden, ohne deren Nachteile in Kauf nehmen zu müssen. In bio-

mechanischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass durch die NIR-Spektroskopie der nichtlineare mechanische Widerstand von Knorpelgewebe mit guter Genauigkeit vorhergesagt werden kann. Durch den Vergleich von Druckbelastung und Reflexion konnte gezeigt werden, dass sich durch eine leichte Druckbelastung die optischen Eigenschaften nicht verändern.

Die Einsatzmöglichkeiten des Systems sind primär eine Unterstützung des Arztes bei der Lokalisation, Klassifizierung und Dokumentation von primären Knorpelschäden. Dadurch kann er bei der Wahl einer Therapie unterstützt werden und diese auch auf den notwendigen Raum begrenzen. Eine Diagnose basierend auf Messwerten stärkt auch seine Position bei rechtlich relevanten Gutachten. Das System kann auch bei der Überwachung des Erfolgs von bekannten und neuen Therapieformen eingesetzt werden, da es den Knorpel bei der Untersuchung nicht verletzt. Besondere Bedeutung könnte es im Tissue Engineering gewinnen. Es wäre damit möglich, sicher gesunden Knorpel zu ernten, um daraus neues Gewebe zu züchten. Die exakte Größe des benötigten Implantats wäre bestimmbar, so dass kein gesundes Gewebe entnommen wird oder schon pathologisches im Gelenk verbleibt. In leicht abgewandelter Form ist damit auch die Überwachung des Wachstums, der Spezialisierung und des Erntezeitpunktes des Zuchtvorgangs *in vitro* möglich.

Mit dem vorgestellten System und den durchgeführten Versuchen konnte der grundsätzliche Lösungsweg aufgezeigt und belegt werden. Die Ergebnisse können jedoch noch aufgrund der geringen Probenzahl und der Unsicherheit der Vergleichsmethoden nicht als sicher genug für eine breite klinische Anwendung eingestuft werden. Dafür sind für die Steigerung der Messgenauigkeit weitere Untersuchungen und eine Optimierung des Messsystems und der Auswertung notwendig. Bisher wurde z.B. nicht die volle Information des Spektrums genutzt, sondern nur ausgewählte Teilbereiche. Bei größerer Probenzahl könnten komplexere Modelle zu einer größeren Robustheit und Messgenauigkeit führen. Letztendlich kann die Messgenauigkeit nur durch ein noch nicht verfügbares Referenzverfahren („goldener Standard“) bewer-

tet und verbessert werden. Bis dahin können nur große Probenzahlen mit möglichst vielen Vergleichswerten die Aussagekraft verbessern. Auch wenn in der Literatur keine Schäden durch die eingesetzten Strahlungsenergien bekannt sind und diese als unwahrscheinlich eingestuft werden, können nur Studien an Knorpelgewebe endgültig klären, ob Zellen und Matrix durch die eingestrahlte Energie wirklich unbeschädigt bleiben.

Das vorliegende System ist in dem Stadium eines Funktionsmusters, für den Routineeinsatz sind noch eine Reihe von Entwicklungsschritten notwendig. Der nächste Schritte ist die Durchführung erster Studien im klinischen Umfeld, um die Einsatzfähigkeit während realer Arthroskopien zu überprüfen. Sollten dadurch die bisherigen Ergebnisse bestätigt werden, sind die nächsten Ziele eine Evaluierung der Messwerte an größeren Probenzahlen und die Untersuchung weiterer Einflussgrößen. Diese könnten Alter, Geschlecht, weitere medizinische Befunde, Lage des Knorpels im Gelenk oder andere Gelenke sein. Zusätzlich muss die Bedienung weiter vereinfacht werden, was eine automatische Referenzierung beinhalten könnte. Eine online-Auswertung und ein direktes Feedback an den Arzt (z. B. akustisch) sowie eine optimierte Benutzeroberfläche sind weitere wichtige Entwicklungsschritte. Diese wären Teil eines kompletten Redesigns, das unter Beachtung des Medizinproduktegesetzes das vorgestellte Konzept für die Serienfertigung überarbeitet. Dabei sind neben der Sicherheit auch wirtschaftliche Aspekte zu beachten. Die Integration in einen Endoskopieturm wäre die sinnvollste Bauform des Gesamtsystems.

In daran anschließenden Entwicklungsschritten ist die Optimierung des Spektralbereichs ein sehr interessanter Ansatz. Bei Ausweitung in den UV-VIS-Bereich könnten Autofluoreszenzen für zusätzliche Informationen genutzt werden oder eine Analyse der Knorpelfarbe weitere Informationen liefern. Eine Erweiterung zu größeren Wellenlängen (vor allem hin zum ersten Wasser-Oberton zwischen 1.900 nm und 2.000 nm oder sogar zur Region der Kombinationsbanden (2.000 nm bis 2.700 nm) könnte das Signal wesentlich deut-

---

licher machen und differenziertere Analysen von Gewebe ermöglichen. Eine Kombination von 3D-bildgebenden Modalitäten mit einem Arthroskop und der Sonde könnte eine genaue Dokumentation der Lokalisation der spektralen Befunde ermöglichen, was besonders bei der Verlaufskontrolle einen großen Vorteil darstellen würde. Neue Entwicklungen bei spektraler Bildgebung deuten die Möglichkeit an, in Zukunft Spektalkameras an Endoskope koppeln zu können und so eine komplette Gewebefläche schnell zu analysieren. Bisherige Kamerasysteme sind dazu allerdings noch zu langsam (Messzeiten von mehreren Minuten pro Bild) und zu teuer (mehrere hunderttausend Euro). Die Auswertung der Bilddaten ist zusätzlich wesentlich aufwändiger, da die komplexen Optiken der Endoskope auf den visuellen Bereich optimiert sind und so starke spektrale Verzerrungen im NIR zu erwarten sind.

# LITERATURVERZEICHNIS

- [1] ABBOTT, A. E., W. N. LEVINE und V. C. MOW: *Biomechanics of articular cartilage and menisci of the adult knee*. In: CALLAGHAN, J. J., A. G. ROSENBERG, H. E. RUBASH und P. T. SIMONIAN und T. L. WICKIEWICZ (Herausgeber): *The adult knee*, Seiten 81–104. Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Baltimore, New York, London, Buenos Aires, Hong Kong, Sydney, Tokyo, 2003.
- [2] ADAMSON, J., S. EBRAHIM, P. DIEPPE und K. HUNT: *Prevalence and risk factors for joint pain among men and women in the West of Scotland Twenty-07 study*. *Annals of the Rheumatic Diseases*, Seiten 520–524, 65 2006.
- [3] ADHIKARI, B., T. HOWES, B. R. BHANDARI und V. TROUNG: *Stickiness in Foods: A Review of Mechanisms and Test Methods*. *International Journal of Food Properties*, 4(1):1–33, 2002.
- [4] AISEN, A. M., W.J. MCCUNE, A. MACGUIRE, P.L. CARLSON, T.M. SILVER und S.Z. JAFRI und W. MARTEL: *Sonographic evaluation of the cartilage of the knee*. *Radiology*, 153:781–784, 1984.
- [5] AURICH, M., A. R. POOLE, A. REINER, C. MOLLENHAUER, A. MARGULIS und K. E. KUETTNER und A. A. COLE: *Matrix homeostasis in aging normal human ankle cartilage*. *Arthritis Rheum*, 46:2903–2910, 2002.
- [6] AURICH, M., G.R. SQUIRES, A. REINER, J.A. MOLLENHAUER, K. E. KUETTNER, A.R. POOLE und A.A. COLE: *Differential matrix*



- degradation and turnover in early cartilage lesions of human knee and ankle joints.* Arthritis Rheum 2005, 52:112–119, 2005.
- [7] BAE, D. K., K. H. YOON und S. J. SONG: *Cartilage healing after microfracture in osteoarthritic knees.* Arthroscopy, 22(4):367–374, Apr 2006.
- [8] BARGEL, HANS-JÜRGEN und GÜNTER SCHULZE: *Werkstoffkunde*, Band 9, Kapitel Werkstoffprüfung, Seiten 114–119. Springer, Berlin, 2005.
- [9] BIBLIOGRAPHISCHES INSTITUT MANNHEIM: *Das Fremdwörterbuch.* Dudenverlag, 1974.
- [10] BOEHRINGER INGELHEIM MICROPARTS: *NIR-Mikrospektrometer.* [http://www.boehringer-ingelheim.de/produkte/mikrosystemtechnik/mikrooptik/nir\\_fs\\_en.pdf](http://www.boehringer-ingelheim.de/produkte/mikrosystemtechnik/mikrooptik/nir_fs_en.pdf), Oct. 2006.
- [11] BOUSHEL, R. und C.A PIANTADOSI: *Near-infrared spectroscopy for monitoring muscle oxygenation.* Acta Physiologica Scandinavica, 168(4):615–622, 2000.
- [12] BRERETON, RICHARD G.: *Chemometrics : Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant.* John Wiley & Sons, 10 Auflage, 2003.
- [13] BRITTBERG, M.: *ICRS Cartilage injury evaluation package.* In: *3rd ICRS Meeting*, Göteborg, Sweden, 2000. International Cartilage Repair Society.
- [14] BROCKHAUS, F.A. (Herausgeber): *Brockhaus-Enzyklopädie*, Band 19. F.A. Brockhaus GmbH, 1993.
- [15] BROMMER, H., P. A. J. BRAMA, M. S. LAASANEN, H. J. HELMINEN AND T.R. VAN WEEREN und J. S. JURVELIN: *Functional adaptation of articular cartilage from birth to maturity under the influence of loading: a biomechanical analysis.* Equine Veterinary Journal, 37(2):148–154, 2005.

- [16] BUCKLAND-WRIGHT, J.C., D. G. MACFARLANE, J.A. LYNCH und M.K. JASANIAND C.R. BRADSHAW: *Joint space width measures cartilage thickness in osteoarthritis of the kniee: High resolution plain film and double contrast macroradiographic investigation*. Ann Rheum Dis, 54(236-268), 1995.
- [17] BUCKLAND-WRIGHT, J.C., D. G. MACFARLANE, S.A. WILLIAMS und R.J. WARD: *Accuracy and presicion of jonit space width measurements in standard and macro-radiographs of osteoarthritic knees*. Ann Rheum Dis, 54(872-880), 1995.
- [18] BURMESTER, GERD-RÜDIGER: *Differentialdiagnostik der Arthrose*. Journal of Clinical Research, 6(2), 2000.
- [19] CAMACHO, NANCY P., PAUL WEST, PETER A. TORZILLI und RICHARD MENDELSON: *FTIR microscopic imaging of collagen and proteoglycan in bovine cartilage*. Biopolymers, 62(1):1-8, 2001.
- [20] CONZEN, JÖRG-PETER: *Multivariate Kalibration - Ein praktischer Leitfaden zur Methodenentwicklung in der quantitativen Analytik*. Bruker Optik GmbH, 2001.
- [21] COZZOLINO, D., L. LIU, W. U. CYNKAR, R. G. DAMBERGS, L. JANIKAND C. B. COLBY und M. GISHEN: *Effect of temperature variation on the visible and near infrared spectra of wine and the consequences on the partial least square calibrations developedto measure chemical composition*. Analytica Chimica Acta, (588):224-230, Feb 2007.
- [22] DATA TRANSLATION, INC: *DT9800 Series*. [http://www.datx.com/products\\_hardware/prod\\_dt9800-series.htm](http://www.datx.com/products_hardware/prod_dt9800-series.htm), Oct. 2006.
- [23] DEHGHANI, H. und D. T. DELPY: *Near-Infrared Spectroscopy of the Adult Head: Effect of Scattering and Absorbing Obstructions in the Cerebrospinal Fluid Layer On Light Distribution in the Tissue*. Appl. Opt, 39:4721-4729, 2000.

- [24] DIN DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG E. V.: *DIN-Taschenbuch 22*, Kapitel DIN 5031-8, 1.4. Beuth, Feb 1999.
- [25] DREXLER, W., D. STAMPER, C. JESSER, X. LI, C. PITRIS, K. SAUNDERS AND S. MARTIN, M. B. LODGE, J. G. FUJIMOTO und M. E. BREZINSKI ME: *Correlation of collagen organization with polarization sensitive imaging of in vitro cartilage: implications for osteoarthritis*. J Rheumatol., 28(6):1311, 2001.
- [26] DUDEN VERLAG: *Die deutsche Rechtschreibung*, Band 1. Bibliographisches Institut, Mannheim, 24 Auflage, 2006.
- [27] ECKSTEIN, FELIX, MAXIMILIAN REISER, KARL-HEINZ ENGLMEIER und REINHARDPUTZ: *In vivo morphometry and functional analysis of human articular cartilage with quantitative magnetic resonance imaging - from image to data, from data to theory*. Anat Embryol, 203(3):147–173, 2001.
- [28] ECKSTEIN, R., F. CICUTTINI, J.P. RAYNAULD, J.C. WATERTON und C.PETERFY: *Magnetic resonance imaging (MRI) of articular cartilage in knee osteoarthritis (OA): morphological assessment*. Osteoarthritis Cartilage, 14(Supp. A):46–75.
- [29] EILERT, ARNOLD J., WILLIAM J. DANLEY und XIAOLU WANG: *Rapid identification of organic contaminants in pretreated waste water using AOTF near-IR spectrometry*. Adv. Instrum. Control, 50(2):87–95, 1995.
- [30] ENGELHARDT, M.: *Epidemiologie der Arthrose in Westeuropa*. Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin, 54(5):171–175, 2003.
- [31] ERGGELET, CHRISTOPH, BERT MANDELBAUM und ANDREAS LAHM: *Der Knorpelschaden als therapeutische Aufgabe*. DEUTSCHE ZEITSCHRIFT FÜR SPORTMEDIZIN, 51(2):48–54, 2000.

- [32] EVANS, C. H., J. N. GOUZE, E. GOUZE, P. D. ROBBINS und S. C. GHIVIZZANI: *Osteoarthritis gene therapy*. *Gene Ther.*, 11(4):379–389, 2004.
- [33] FISCHER, ERICH M. und CARLE M. PIETERS: *Remote determination of exposure degree and iron concentration of lunar soils using VIS-NIR spectroscopic methods*. *Icarus*, 111(2):475–488, 1994.
- [34] FU, XIAPING, YING YIBIN, ZHOU YING und XU HUIRONG: *Application of probabilistic neural networks in qualitative analysis of near infrared spectra: Determination of producing area and variety of loquats*. *Analytica Chimica Acta*, (598):27–33, Jul 2007.
- [35] GALTIER, O., N. DUPUY, Y. LE DREAU, OLLIVIER, C. PINATEL und J. KISTER und J. ARTAUD: *Geographic origins and compositions of virgin olive oils determined by chemometric analysis of NIR spectra*. *Analytica Chimica Acta*, (595):136–144, Oct 2007.
- [36] GELSE, KOLJA, KLAUS VON DER MARK, THOMAS AIGNER, JUNG PARK und HOLMSCHNEIDER: *Articular cartilage repair by gene therapy using growth factor-producing mesenchymal cells*. *Arthritis & Rheumatism*, 48(2):430–441, 2003.
- [37] GESUNDHEITPRO.DE: *Arthroskopie*. [http://www.gesundheitpro.de/-media/F050805ANOND038523/F050805ANOND038881/9300-\\_1591Arthroskopie\\_i5.jpg](http://www.gesundheitpro.de/-media/F050805ANOND038523/F050805ANOND038881/9300-_1591Arthroskopie_i5.jpg), Jan 2007.
- [38] GOLD, GARRY E., THOMAS R. MCCAULEY und MARTHA L. GRAY: *What's New in Cartilage?* *RadioGraphics*, 23:1227–1242, 2003.
- [39] H., HILDEBRANDT: *Psyhyrembl-Klinisches Wörterbuch*. Walter de Gruyter Verlag, 259 Auflage, 1999.
- [40] HENZEL, INGA: *Untersuchung des Druckeinflusses auf die Reflexionseigenschaften des Gelenkknorpels im nahen Infrarot*. Bachelor's Thesis, Technische Universität Hamburg-Harburg, 2006.

- [41] HERRMANN, J. M., C. PITRIS, B.E. BOUMA, S. A. BOPPART, C. A.JESSER, D.L. STAMPER, J. G. FUJIMOTO und M. E. BREZINSKI: *High resolution imaging of normal and osteoarthritic cartilage with opticalcoherence tomography*. J Rheumatol., 26(3):627–635, Mar 1999.
- [42] INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY: *Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry*, Kapitel Electromagnetic Radiation, Seite 30. Blackwell Science Ltd, 2 Auflage, 1993.
- [43] ISAKSSON, TOMAS, LARS P. SWENSEN, RICHARD G. TAYLOR und SVEIN O. FJAERAAND PER O. SKJERVOLD: *Non-destructive texture analysis of farmed Atlantic salmon using visual/near-infrared reflectance spectroscopy*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 82(1):53–60, 2002.
- [44] JÄGEMANN, S. und V. JÄGEMANN: *Die Messung der Knorpeldicke im Patellagleitlager mittels Ultraschall: Methode und Wertigkeit*. Sportverl Sportschad, 6:58–63, 1992.
- [45] JAMES GOLDSTON FACULTY OF ENGINEERING & PHYSICAL SYSTEMS, CENTRAL QUEENSLANDUNIVERSITY: *nir-abs.jpg*. <http://pelm.cqu.edu.au/research/advensors/technologies/spectroscopy/images/nir-abs.jp>, Mar 2006.
- [46] JEFFREY, D R und I WATT: *Imaging hyaline cartilage*. The British Journal of Radiology,, 76:777–787, 2003.
- [47] JETI TECHNISCHE INSTRUMENTE GMBH: *Fiber coupled light source JLQ 2*. <http://www.jeti.com/products/lq.php>, Oct. 2006.
- [48] KEMPSON, G. E., H. MUIR, C. POLLARD und M. TUKE: *The tensile properties of the cartilage of human femoral condyles related to the content of collagen and glycosaminoglycans*. Biochem Biophy Acta, 297:456–472, 1973.

- [49] KLEEMANN, R.U., D. KROCKER, A. CEDRARO, J. TUISCHER und G.N. DUDA: *Altered cartilage mechanics and histology in knee osteoarthritis: relation to clinical assessment (ICRS Grade)*. Osteoarthritis Cartilage, 13(11):985–63, Nov 2005.
- [50] KLUGE, FRIEDRICH und ELMAR SEEBOLD: *Etymologisches Wörterbuch der deutschen Sprache*. Gruyter, 22 Auflage, 1989.
- [51] LAASANEN, MIKKO S., JUHA TÖYRÄS, ANNA I. VASARA, MIKA M. HYTTINEN und SIMO SAARAKKALA, JANI HIRVONEN, JUKKA S. JURVELIN und ILKKA KIVIRANTA: *Mechano-Acoustic Diagnosis of Cartilage Degeneration and Repair*. The Journal of Bone and Joint Surgery, 85(2):78–84, 2003.
- [52] LAI, W. F., C. H. CHANG, Y. TANG, R. BRONSON und C. H. TUNG: *Early diagnosis of osteoarthritis using cathepsin B sensitive near-infrared fluorescent probes*. Osteoarthritis Cartilage., 12(3):239–244., Mar 2004.
- [53] LEE, S. J., I. J. JEON und L. H. HARBERS: *Near-infrared reflectance spectroscopy for rapid analysis of curds during cheddar cheese making*. J. Food Sci., 62:53–56, 1997.
- [54] LI, XINGDE, SCOTT MARTIN, COSTAS PITRIS, RAVI GHANTA, DEBRA STAMPER, MICHELLE HARMAN, JAMES FUJIMOTO und MARK BREZINSKI: *High-resolution optical coherence tomographic imaging of osteoarthritic cartilage during open knee surgery*. Arthritis Res Ther, 7(2):R318–R323, 2005.
- [55] LUCK, S., H. PLETTENBERG und M. HOFFMANN: *Development of an online cell culture monitoring system based on near infrared(NIR) spectroscopy*. In: *Tagungsband BMT-2005*, Band 50, Seiten 1575–1576, Berlin, Sep 2005. DGBMT, Verlag Schiele & Schöne.
- [56] LUYPAERT, J., D. L. MASSART und Y. VANDER HEYDEN: *Near-infrared spectroscopy applications in pharmaceutical analysis*. Talanta, (72):865–883, 2007.

- [57] LYYRA, T., J. P. A. AROKOSKI, N. OKSALA, A. VIHKO, M. HYTTINEN AND J. S. JURVELIN und I. KIVIRANTA: *Experimental validation of arthroscopic cartilage stiffness measurement using enzymatically degraded cartilage samples*. Phys. Med. Biol., 44:525–535, 1999.
- [58] MACALONEY, G., J. W. HALL, M. J. ROLLINS, I. DRAPER, K. B. ANDERSON AND J. PRESTON, B. G. THOMPSON und B. MCNEIL: *The utility and performance of near infrared spectroscopy in simultaneous monitoring of multiple components in a high cell density recombinant Escherichiacoli production process*. Bioprocess Eng, 17(3):157–167, 1997.
- [59] MALIN, STEPHEN F., TIMOTHY L. RUCHTI, THOMAS B. BLANK, SURESH N. THENNADIL und STEPHEN L. MONFRE: *Noninvasive Prediction of Glucose by Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectroscopy*. Clinical Chemistry, 45(9):1651–1658, 1999.
- [60] MANKIN, H. J., H. DORFMAN, L. LIPPIELLO und A. ZARINS: *Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data*. J Bone Joint Surg Am, 53:523–537, 1971.
- [61] MANSFIELD, JAMES R., MICHAEL G. SOWA und HENRY H. MANTSCH: *Proceedings of SPIE – Volume 3920 Spectral Imaging: Instrumentation, Applications and Analysis*, Kapitel Development of visible and near-IR LCTF-based spectroscopic imaging systems for macroscopic samples, Seiten 99–107. 2000.
- [62] MARUO, KATSUHIKO, TOMOHIRO OOTA, MITSUHIRO TSURUGI, TAKEHIRO NAKAGAWA AND HIDENOBU ARIMOTO, MAMORU TAMURA, YUKIHIRO OZAKI und YUKIO YAMADA: *New Methodology to Obtain a Calibration Model for Noninvasive Near-Infrared Blood Glucose Monitoring*. Applied Spectroscopy, 60(4):441–449, 2006.
- [63] MCNAUGHT, A. D. und A. WILKINSON: *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*, Kapitel absorbance. Blackwell Science, 1997.

- [64] MENDEL, K., N. ELIAZ, D. HENDEL und N. HALPERIN: *APPLICATION OF BIO-FERROGRAPHY TO THE STUDY AND OBJECTIVE DIAGNOSIS OF OSTEOARTHRITIS AND OTHER HUMAN JOINT DISEASES*. J Bone Joint Surg Br, 87-b(Supp III):391, 2005.
- [65] MOHANTY, LIPI, SWEE CHUAN TJIN, DENNY T.T. LIE und SILVINO E.C. PANGANIBANAND PIERCE K.H. CHOW: *Fiber grating sensor for pressure mapping during total knee arthroplasty*. Sensors and Actuators, (135):323–328, Aug 2006.
- [66] MORENO, PEDRO R., ROBERT A. LODDER, K. RAMAN PURUSHOTHAMAN, WILLIAME. CHARASH, WILLIAM N. O’CONNOR und JAMES E. MULLER: *Detection of Lipid Pool, Thin Fibrous Cap, and Inflammatory Cells in Human Aortic Atherosclerotic Plaques by Near-Infrared Spectroscopy*. Circulation, 105:923–927, 2002.
- [67] MOTULSKY, HARVEY: *Intuitive Biostatistics*. Oxford University Press, New York, 1995.
- [68] NAGEL, HORST: *Thermogravimetrische Materialfeuchtebestimmung - Grundlagen und praktische Anwendungen*. verlag moderne industrie, 2002.
- [69] NAKAZAWA, T.: *Workshop on High Performance Switching and Routing, 2002. Merging Optical and IP Technologies*, Kapitel Acousto-optic tunable filter (AOTF), Seiten 345– 345. HPSR, 2002.
- [70] NIEMINEN, KEIKKI J., JUHA TÖYRÄS, JARNO RIEPPO, MIIKA T. NIEMINENAND JANI HIRVONEN, RAMI KORHONEN und JUKKA S. JURVELIN: *Real-Time Ultrasound Analysis of Articular Cartilage Degradation in Vitro*. Ultrasound in Med. & Biol., 28(4):519–525, 2002.
- [71] NIEMINEN, MIIKA T., JUHA TÖYRÄS, MIKKO S. LAASANEN, JOHANNA SILVENNOINENAND HEIKKI J. HELMINEN und JUKKA S. JURVELIN: *Prediction of biomechanical properties of articular cartilage with quantitative magnetic resonance imaging*. Journal of Biomechanics, 37:321–328, 2004.



- [72] NORRIS, K. H. und J. R. HART: *Direct spectrophotometric determination of moisture content of grain and seeds*. In: WAXLER, A. (Herausgeber): *Principles and Methods of Measuring Moisture Content in Liquids and Solids*, Band 4. Reinhold Publishing Corporation, New York, 1965.
- [73] OSBORNE, B. G., T. FEARN und P. H. HINDLE: *Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis*. Longman Scientific & Technical, 2 Auflage, 1993.
- [74] OSTERGAARD, KELD, CLAUS B. ANDERSEN, JORGEN PETERSEN und KLAUS BENDTZENAND DONALD M. SALTER: *Validity of histopathological grading of articular cartilage from osteoarthritic knee joints*. *Ann Rheum Dis*, 58:208–213, Apr 1999.
- [75] OUTERBRIDGE, R. E.: *The etiology of chondromalacia patellae*. *J Bone Joint Surg Br*, 43-B:752–757, 1961.
- [76] OWEN-REECE, H., M. SMITH, C. E. ELWELL und J. C. GOLDSTONE: *Near infrared spectroscopy*. *Br J Anaesth*, 82(3):418–426, 1999.
- [77] PAN, YINGTIAN, ZHIGANG LI, TUQIANG XIE und CONSTANCE R. CHU: *Hand-held arthroscopic optical coherence tomography for in vivo high-resolution imaging of articular cartilage*. *Journal of Biomedical Optics*, 8(4):648–654, 2003.
- [78] PATRICK GARNERO, JEAN-CHARLES ROUSSEAU und PIERRE D. DELMAS: *Molecular basis and clinical use of biochemical markers of bone, cartilage and synovium in joint diseases*. *Arthritis and Rheumatism*, 42(4):953–968, 2000.
- [79] PEARLE, ANDREW D., RUSSEL F. WARREN und SCOTT A. RODEO: *Basic science of articular cartilage and osteoarthritis*. *Clin Sports Med*, 24(1):1–12, Jan 2005.

- [80] PELLETIER, J-P und J MARTEL-PELLETIER: *Therapeutic targets in osteoarthritis: from today to tomorrow with new imaging technology*. Ann Rheum Dis, 62(Suppl II):ii79–ii82, 2003.
- [81] PLETTENBERG, H. K. W. und G. SPAHN: *Untersuchungen zur Eignung der NIR-Spektroskopie zur Bewertung von Knorpelschäden*. In: *Struktur und Dynamik biologischer Zellen mit optischen Methoden auf der Spur*, Friedrich-Schiller-Universität, Jena, März 2005. Biophotonics.
- [82] PLETTENBERG, H.K.W., G. SPAHN und M. HOFFMANN: *Spektroskopische Untersuchungen von Knorpelgewebe zur Klassifizierung von Arthrose*. In: *Biomedizinische Technik*, Ilmenau, Germany, September 2004. DGBMT.
- [83] PLETTENBERG, HOLGER K.W., GUNTER SPAHN, HORST NAGEL, THOMAS MÜCKLEYAND GUNTHER O. HOFMANN und MARTIN HOFFMANN: *Direct Determination of Cartilage Damages by*. In: *spec2006 -Shedding Light on Disease: Optical Diagnosis for the New Millennium*, Congress Center German Cancer Research Center Heidelberg, May 2006.
- [84] PONOMAREV, I., D. PAUL, M. NEUMANN und I. WILKE: *Scaffold-free chondrocyte transplantation as alternative to matrix associated chondrocyte transplantation*. In: *Abstracts of European Cells and Materials*, Band 12, Seite 68, Congress Centre, Davos, Switzerland, Aug. 2006.
- [85] POTTER, K., L. H. KIDDER, I. W. LEVIN, E. N. LEWIS und R. G. SPENCER: *Imaging of collagen and proteoglycan in cartilage sections*. Arthritis Rheum, 44(4):846–855, 2001.
- [86] PUHL, W.: *Volkskrankheit Arthrose*. Future Special Science 1, 1:12–19, 1995.
- [87] RENDELL, M., E. ANDERSON, W. SCHLUETER, J. MAILLIARD und D. HONIGSAND R. ROSENTHAL: *Determination of hemoglobin levels in the finger using near infrared spectroscopy*. Clinical & Laboratory Haematology, 25:93, 2003.

- [88] ROHE, THOMAS, EDNA GRUENBLATT und NORBERT EISENREICH: *Near-infrared-transmission spectroscopy on propellants and explosives*. In: *Int. Annu. Conf.*, Band 27, Seiten 85.1–85.10, 1996.
- [89] ROYCHOUDHURY, PAYAL, RONAN O. KENNEDY, BRIAN McNEIL und LINDA M. HARVEY: *Multiplexing fibre optic near infrared (NIR) spectroscopy as an emerging technology to monitor industrial bioprocesses*. *Analytica Chimica Acta*, (590):110–117, Mar 2007.
- [90] SANDELL, L. J. und T. M. HERING: *Biochemistry and molecular and cell biology of articular cartilage in osteoarthritis*. In: MOSKOWITZ, R. W., D. S. HOWELL, R. D. ALTMAN und J. A. BUCKWALTER AND V. M. GOLDBERG (Herausgeber): *Osteoarthritis. Diagnosis and medical /surgical management*, Kapitel Biochemistry and molecular and cell biology of articular cartilage in osteoarthritis, Seiten 115–143. WB Saunders Company, Philadelphia, London, New York, St Louis, Sydney, Toronto, 2001.
- [91] SCHMIDT, WERNER: *Optische Spektroskopie*. WILEY-VCH, 2 Auflage, 2000.
- [92] SCHNIER, MICHAEL: *Validierung dreidimensionaler MRT-basierter Knorpelvolumen und -dickenmessungen*. Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2002.
- [93] SCHULZ, GABRIELE, MARKUS WEISS, URS BAUERSFELD, JAN TELLER, DANIEL HAENSSE, HANS BUCHER und OSKAR BAENZIGER: *Liver tissue oxygenation as measured by near-infrared spectroscopy in the critically ill child in correlation with central venous oxygen saturation*. *Intensive Care Medicine*, 28(2):184–189, 2002.
- [94] SEGARS, R. A. und E. A. JOHNSON: *Seafood quality determination*, Kapitel Instrumental measurement of the textural quality of fish flesh: effect of pH and cooking temperature, Seiten 49 – 61. D.E. Kramer and J. Liston, Anchorage, Alaska, USA, 1986.

- [95] SETTON, LORI A., DAWN M. ELLIOTT und VAN C. MOW: *Altered mechanics of cartilage with osteoarthritis: human osteoarthritis and an experimental model of joint degeneration*. Osteoarthritis and Cartilage, 7:2–14, 1999.
- [96] SHAW, R. A., S. KOTOWICH, H. H. EYSEL, M. JACKSON und G. T. D. THOMSON AND H. H. MANTSCH: *Arthritis diagnosis based upon the near-infrared spectrum of synovial fluid*. Rheumatology International, 15(4):159–165, 1995.
- [97] SHAW, R.A., S. KOTOWICH, H. H. MANTSCH und M. LEROUX: *Quantitation of Protein, Creatinine, and Urea in Urine by Near-Infrared Spectroscopy*. Clinical Biochemistry, 29(1):11–19, 1996.
- [98] SOLVER, FREDERICK H., GINO BRADICA und ALFRED TRIA: *Relationship among biomechanical, biochemical and cellular changes associated with osteoarthritis*. Critical Reviews in Biomedical Engineering, 29(4):373–391, 2001.
- [99] SPAHN, G., H. PLETTENBERG, M. HOFFMANN, M. KLINGER und B. PFEIFFER: *Infrarot-Spektroskopische Messung auf der Knorpeloberfläche: eine Möglichkeit zur Bestimmung degenerativer chondraler Veränderungen*. In: *68. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie, 90. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie und 45. Tagung des Berufsverbandes der Fachärzte für Orthopädie*, Berlin, Germany, October 2004. Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie.
- [100] SPAHN, G., H. PLETTENBERG, M. HOFFMANN, M. KLINGER und B. PFEIFFER: *Semiquantitative evaluation of chondral damages by near infrared spectroscopy*. In: *World Congress on Osteoarthritis*, Chicago, USA, December 2004. Osteoarthritis Research Society International.
- [101] SPAHN, G., H. PLETTENBERG, M. HOFFMANN, B. PFEIFFER und H.M. KLINGER: *Semiquantitative evaluation of chondral damages by near infrared spectroscopy*. Osteoarthritis Cartilage, 12:121–122, 2004.

- [102] SPAHN, G., R. WITTIG, E. KAHL, H.M. KLINGER, T. MÜCKLEY und G.O. HOFMANN: *Diagnostik von Knorpelschäden des Kniegelenks*. Der Unfallchirurg, 110(5):414–424, May 2007.
- [103] SPAHN, GUNTER: *Knorpelschaden und Gonarthrose. Teil I: Physiologie und Pathophysiologie des Knorpels und der Gonarthrose*. Aktuelle Traumatologie, 2006.
- [104] SPAHN, GUNTHER: *Über den Einfluß von frischen Läsionen am Knorpel auf dessen Histochemie und Histopathologie*. Persönliches Gespräch, Aug 2005.
- [105] SPAHN, GUNTHER: *Vergleich der biochemischen Zusammensetzung von Knorpel in verschiedenen Tiermodellen*. Persönliches Gespräch, Mar 2007.
- [106] SPIRT, A. A., A. F. MAK und R. P. WASELL: *Nonlinear viscoelastic properties of articular cartilage in shear*. J Orthop Res, 7:43–49, 1989.
- [107] TAKACS, GABOR, TIBOR POKORNY und ISTVAN BANYASZ: *Application of a portable near-infrared analyzer for wheat measurement*. In: DAVIES, ANTHONY M. C. und PHIL C. WILLIAMS (Herausgeber): *Proc. Int. Conf. Near-infrared Spectrosc.*, Band 7, Seiten 92–97, 1996.
- [108] UCHIYAMA, A., T. OHISHI, M. TAKAHASHI, K. KUSHIDA, T. INOUE AND M. FUJIE und K. HORIUCHI: *Fluorophores from aging human articular cartilage*. Journal of Biochemistry, 110(5):714–718, 1991.
- [109] VIRTANEN, SATU, OSMO ANTIKAINEN und JOUKO YLIRUUSI: *Uniformity of poorly miscible powders determined by near infrared spectroscopy*. International Journal of Pharmaceutics, (345):108–115, May 2007.
- [110] WECKNER, UTA: *Vergleich von biomechanischen und spektroskopischen Eigenschaften von Gelenkknorpeln*. Diplomarbeit, Technische Universität Ilmenau, 2005.

- [111] WEST, P.A., P.A. RORZILLI, C. CHEN, P. LN und N.P. CAMACHO: *Fourier transform infrared imaging spectroscopy analysis of collagenase-induced cartilage degradation*. Journal of Biomedical Optics, 10(1):014015-1-014015-7, Feb 2005.
- [112] WILKE, INGO: *Vergleich der biochemischen Zusammensetzung von Knorpel in verschiedenen Tiermodellen*. Persönliches Gespräch, Feb 2007.
- [113] WITT, C., B. BRINKHAUS, S. JENA, K. LINDE, A. STRENG, S. WAGENPFEILAND J. HUMMELSBERGER, H. WALTHER, D. MELCHART und S. WILICH: *Acupuncture in patients with osteoarthritis of the knee: a randomised trial*. The Lancet, 366(9480):136-143, 2005.
- [114] WOLD, H.: *Multivariate Analysis*, Kapitel Estimation of principal components and related models by iterative leastsquares, Seiten 391-420. P.R. Krishnaiah, Academic Press, New York, 1966.
- [115] YAO, HSIN-YUN, VINCENT HAYWARD und RANDY E. ELLIS: *A Tactile Magnification Instrument for Minimally Invasive Surgery*. In: BARRILLOT, C., D.R. HAYNOR und P. HELLIER (Herausgeber): *MICCAI 2004*, Seiten 89-96. LNCS, 2004.
- [116] YEBOAH, S. AGYARE, REGIS CINIER und JEAN GUILMENT: *Quantitative analysis of resorcinol in aqueous solution by near-infrared spectroscopy from the laboratory to the production floor*. In: DAVIES, ANTHONY M. C. und PHIL C. WILLIAMS (Herausgeber): *Proc.Int. Conf. Near-infrared Spectrosc*, Seiten 279-287, 1996.
- [117] YOUN, JONG IN: *Non-invasive optical diagnostics of cartilage*. Doktorarbeit, The University of Texas at Austin, Jan 2006.

# DANKSAGUNGEN

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Hartmut Witte für die Betreuung dieser Arbeit, die vielen hilfreichen Hinweise und den nötigen Freiraum.

Ohne die Unterstützung von Herrn Dr. Martin Hoffmann, meinem Chef am fzmb, hätte diese Arbeit nicht entstehen können.

Bei meinen Kollegen vom fzmb bedanke ich mich für die vielen kleinen und nicht ganz so kleinen Dinge, die mir sehr geholfen haben. Insbesondere möchte ich mich bei Dr. Ingo Wilke und Herrn Ponomarev für ihre Unterstützung bei den Untersuchungen des Neo-Knorpels und der Extraktion von Kollagen II bedanken und bei Dr. Dirk Barnewitz und bei Frau Sabine Kussmann für die Hilfe bei den Schafsversuchen.

Bei Herrn Dr. Gunter Spahn bedanke ich mich für gute Zusammenarbeit und die Betreuung der medizinischen Seite der Versuche.

Diese Arbeit beinhaltet auch viele Arbeitsstunden, die Frau Dipl.-Ing. Uta Weckner im Rahmen ihrer Diplomarbeit, Frau B.Sc. Inga Henzel für ihre Bachelorarbeit und Herr Cand.-Ing. (BA) Conrad Meder in seiner Praktikumsarbeit geleistet haben.

Bei Frau Dr. Kristina Nielsen, Frau Elisabeth Stukenkemper, Frau Monique Weinert und Herrn Werner Reiprich bedanke ich mich für ihre Korrekturen

und Anregungen.

Frau Wille und Herrn Prof. Antal Huba haben mir sehr geholfen, einen Teil dieser Arbeit in Budapest anfertigen zu können.

Bei Frau Dr. Schmidt von der Fa. Jasco möchte ich mich herzlich für ihre Unterstützung bei den UV-VIS-Messungen bedanken.

Ein großer Dank gilt Frau Kollberg von der Thüringer Landfleischerei und ihren Söhnen für die unkomplizierte und kostenlose Beschaffung der Schweineknrie.

Herrn Nagel von der Sartorius AG danke ich für seine Hilfe und Gelassenheit bei der Wassergehaltsmessung der Schafsknorpel.

Ein besonderer Dank gilt all jenen, die mich in diesen unruhigen Zeiten aufgenommen und unterstützt haben: Martin und Jana, Christoph, Hannah, Claus, meine Eltern, Frank und Bibi (und natürlich Simone und Verena), Katja, Susi, Mathias, Isabella, Claudia, Werner und vielen mehr.

Die Geräte- und Verfahrensentwicklung wurde unterstützt durch das Bundesministeriums für Wirtschaft und Technologie BMWi innerhalb des Programms „Förderung von Forschung, Entwicklung und Innovationen in kleinen und mittleren Unternehmen und externen Industrieforschungseinrichtungen in den neuen Bundesländern“ (Reg.Nr: IW041019).

Die Entwicklung der Knorpelimplantate (3.3.1) erfolgte im Forschungsprojekt „Scaffold-free chondrocyte transplantation as alternative to matrix associated chondrocyte transplantation“, dass vom Freistaat Thüringen unterstützt wurde (2004 WF 0163).



Die Aufenthalte in Budapest wurden unterstützt durch die EU im Rahmen des Leonardo-Programms.

## **Thesen zur Dissertation „Entwicklung eines Messsystems zur Untersuchung arthrotischer Knorpelschäden mittels naher Infrarot-Spektroskopie für den Einsatz in der Arthroscopie“, vorgelegt von Dipl.-Ing. Holger Plettenberg**

1. Der Nachweis von frühen Stadien der Arthrose ist bisher nur unzufriedenstellend durchführbar
2. Mit naher Infrarot-Spektroskopie ist es grundsätzlich möglich, Aspekte früher Stadien von Arthrose nachzuweisen
3. Es kann ein Messsystem aufgebaut werden, mit dem die Reflexion von Gelenkknorpel im NIR gemessen werden kann
4. Es kann eine Sonde hergestellt werden, mit der während einer Arthroscopie Gelenkknorpel spektroskopisch untersucht werden kann
5. Das Messsystem und Sonde können so gestaltet werden, dass der Einsatz weitgehend gefahrlos für Operateur und Patient ist
6. Die Absorption im NIR von nativem Knorpel und durch Tissue Engineering erzeugtem Neo-Knorpel zeigt deutliche Unterschiede
7. Mittels NIR-Spektroskopie kann Knorpel ähnlich gut bewertet werden wie mit klassischen medizinischen Methoden
8. Mechanische Eigenschaften von Gelenkknorpel spiegeln sich in seinen spektralen Eigenschaften wieder
9. Mäßige Druckbelastung auf den Knorpel ändert nicht seine spektralen Eigenschaften

## Erklärung

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

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise ~~entgeltlich~~/unentgeltlich geholfen:

1. Dr. Spahn bei der Durchführung und medizinischen Befundung der Schafsexperimente

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten ( Promotionsberater oder anderer Personen ) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalte der vor gelegten Dissertation stehen.

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

Ich bin darauf hingewiesen worden, dass die Unrichtigkeit der vorstehenden Erklärung als Täuschungsversuch angesehen wird und den erfolglosen Abbruch des Promotionsverfahrens zu Folge hat.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)