



INAUGURAL

## DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet. beim Fachbereich  
Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

### **Multiparametrische MR-Bildgebung als nicht-invasiver Biomarker für Meniskus-Degenerationen beim Hund**

Mag.med.vet. Lena Bunzendahl-Först

2025

Für meine Familie.

Aus „Klinik für Kleintiere“

Betreuer/in: Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Martin Kramer

**und**

„Tierklinik des tierärztlichen Institutes Göttingen“

Betreuer/-in: apl. Prof. Dr. Stephan Neumann

**Multiparametrische MR-Bildgebung als nicht invasiver Biomarker  
für Meniskusdegenerationen beim Hund**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von **Lena Bunzendahl-Först**

Tierärztin aus Wolfenbüttel

Gießen 2025

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

Erstgutachter: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Martin Kramer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Stephan Neumann

Prüfer: Prof. Dr. Anja Taubert

Tag der Disputation: 01.12.2025

## Abkürzungsverzeichnis

PRP	plättchenreiches Plasma
MRT	Magnetresonanztomographie
MT	Magnetisierungstransfer
MTR	Magnetisierungstransfer-Ratio
qMT	quantitativer Magnetisierungstransfer
GRE	Gradientenecho-Sequenz
TE	Echozeit
GAG	Glykosaminoglykane
gagCEST	glycosaminoglycan specific chemical exchange saturation transfer

## **Inhaltsverzeichnis**

1. Einleitung	1
2. Publikation I: Histological Findings and T2 Relaxation Time in canine Menisci of Elderly Dogs—An Ex Vivo Study in Stifle Joints	8
3. Publikation II: Magnetisation transfer, T1 and T2* relaxation in canine menisci of elderly dogs - an <i>ex vivo</i> study in stifle joints	28
4. Übergreifende Diskussion	50
4.1. Diskussion der angewandten Methoden	51
4.2. Diskussion und Interpretation der Ergebnisse	57
4.3. Schlussfolgerungen	61
5. Zusammenfassung	63
6. Summary	66
7. Literaturverzeichnis	69
8. Publikationsverzeichnis	67
9. Erklärung	68

## 1. Einleitung

Das Kniegelenk ist als ein komplexes synoviales Gelenk sowohl beim Menschen als auch beim Hund häufig vom Erkrankungsbild der Osteoarthrose betroffen. Die Gonarthrose ist durch ihren chronischen progredienten Verlauf gekennzeichnet und kann zu erheblichen Einschränkungen der Lebensqualität von betroffenen Patienten führen. Sie resultiert immer in einer verminderten Bewegungsfreiheit (Range of motion) des betroffenen Gelenkes und ist durch die Abnutzung des Gelenkknorpels, Veränderungen im subchondralen Knochen, der Entstehung von Osteophyten und der begleitenden Synovialitis gekennzeichnet (CHU et al., 2012). Beim Hund tritt die Gonarthrose vor allem im Rahmen einer Ruptur des cranialen Kreuzbandes und aufgrund von Patellaluxationen auf (POWNDER, HAYASHI, CASERTO, NORMAN et al., 2018).

Im Rahmen der Arthrose kommt es zu Veränderungen von allen am Gelenk beteiligten Strukturen. Dass neben dem Gelenkknorpel somit auch den Menisken des Kniegelenkes eine zentrale Bedeutung im Rahmen der Gonarthrose zukommt, findet zunehmend Beachtung. Meniskuspathologien beeinflussen sowohl den Schweregrad als auch das Voranschreiten einer Arthrose. Dabei können unterschiedliche Arten von Meniskussschäden sich unterschiedlich auf den Krankheitsverlauf auswirken (MACFARLANE et al., 2017; ANTONY et al., 2017). Sie spielen somit eine wichtige Rolle im Geschehen der Osteoarthrose und sind daher immer wieder Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten, die sich mit der Pathogenese und den Mechanismen der Arthroseentstehung befassen.

Die Menisken des Kniegelenkes liegen als Mandarinen-förmige Faserknorpelscheiben auf dem medialen und lateralen Tibiaplateau. Sie erfüllen wichtige Aufgaben in der recht komplexen Biomechanik des Kniegelenkes. Sie gleichen eine gewisse Inkongruenz im Gelenk aus und verteilen bzw. minimieren Druckbelastungen, sodass der hyaline Gelenkknorpel vor Schäden geschützt werden kann (FOX et al., 2015; HU et al., 2019). Somit sind die Menisken essentiell, um eine physiologische Bewegung im Kniegelenk zu ermöglichen und das Gelenk vor Stoß- und Druckbelastungen zu schützen. Intakte Menisken sind also eine Grundvoraussetzung für die langfristige Gesunderhaltung des Kniegelenkes (MCDERMOTT, 2011). Aufgebaut sind die Menisken aus Knorpelzellen und einer so genannten extrazellulären Matrix. Diese extrazelluläre Matrix besteht aus Wasser, Kollagen und Proteoglykanen. Der Hauptanteil des enthaltenen Kollagens wird vom Typ 1 gebildet, deutlich weniger enthalten sind die Kollagen Typen 2,3 und 4. Bei den enthaltenen Proteoglykanen handelt es sich hauptsächlich um große, aggregierene Proteoglykane mit Chondroitinsulfat als vorherrschendem Glykosaminoglykan

(MCDEVITT u. WEBBER, 1990; AUFDERHEIDE u. ATHANASIOU, 2004; ABRAHAM et al., 2011; AIDOS et al., 2022).

Neben den beschriebenen makroskopisch sichtbaren Pathologien kommt es zu morphologischen, biomechanischen, biochemischen und molekularen Veränderungen aller am Gelenk beteiligten Strukturen. Daraus ergibt sich, dass auch die Menisken von solchen Veränderungen betroffen sind. Eine objektive Beurteilung der Struktur und Zusammensetzung des Meniskusgewebes kann ein wichtiger prognostischer Marker sein, um frühzeitige Veränderungen im Gelenk registrieren zu können. Vor allem bei Patienten, die beispielsweise nach einer Kreuzbandruptur ein Risiko für Osteoarthritis aufweisen, kann eine Früherkennung den Verlauf der Erkrankung positiv beeinflussen (MCDERMOTT, 2011), da eine frühzeitige Therapie die größten Erfolgsaussichten bezüglich der Erhaltung eines funktionalen Gelenkes hat (MOSHER u. DARDZINSKI, 2004).

Die Therapie der Osteoarthritis beschränkt sich neben verschiedenen chirurgischen Eingriffen auf die symptomatische Behandlung der durch sie hervorgerufenen Schmerzen und regenerative Ansätze wie z.B. dem Einsatz von plättchenreichem Plasma (PRP) (COOK et al., 2016; SHARUN et al., 2021; DONECKER et al., 2021; PYE et al., 2022). Der Erfolg der verschiedenen Therapien ist vor allem bei Tieren mit fortgeschrittenem Arthrostadium und Lahmheitsgrad jedoch häufig unzureichend (PYE et al., 2022).

Der Pathomechanismus der Osteoarthritis ist zum aktuellen Zeitpunkt noch unzureichend geklärt. Ein genaueres Verständnis scheint jedoch unabdingbar zu sein, um bessere Therapieformen zu entwickeln. Neben einem tieferen Verständnis über die Entstehung einer Arthrose und der Entwicklung verschiedener Therapieoptionen, kommt aktuell auch der Frühdiagnostik von Gelenksschäden eine zunehmend wichtige Rolle zu. Je früher diese Erkrankung festgestellt wird, desto eher ist eine Therapie auch erfolgreich. Der Verlauf einer Arthrose kann nur bei frühzeitiger Diagnose ggf. verlangsamt und positiv beeinflusst werden.

Kontinuierliche Fortschritte der bildgebenden Verfahren ermöglichen eine immer bessere Diagnostik im Bereich der Osteoarthritis. Mittels klassischer Röntgendiagnostik, die das Gelenk im Optimalfall in mindestens zwei Ebenen abbildet, können Veränderungen der knöchernen Strukturen gut erkannt werden. Konkret umfassen diese radiologischen Veränderungen die Osteophytenbildung, Veränderungen bzw. Sklerosierungen des subchondralen Knochens, das Vorliegen eines Gelenkergusses und eine Verschmälerung des Gelenkspaltes (INNES et al., 2004; CHU et al., 2012). Um eine

möglichst objektive Bewertung von Röntgenbildern durchführen zu können, gibt es verschiedene Röntgenscores. Ein vielfach angewandter Kriterienkatalog ist der „Kellgren-Lawrence-Score“ (KELLGREN u. LAWRENCE, 1957).

Sobald jedoch die oben beschriebenen radiologischen Veränderungen erkennbar sind, liegt immer eine schon fortgeschrittene Osteoarthrose vor. Lange bevor es zu knöchernen bzw. röntgenologisch sichtbaren Veränderungen kommt, finden schon pathologische Veränderungen im Bereich des Knorpels und anderer Weichgewebe des Gelenkes statt. Eine Röntgenuntersuchung bzw. ein Röntgenscoring kann sinnvoll sein, um eine bereits fortgeschrittene Arthrose zu diagnostizieren und deren Verlauf zu kontrollieren. Sie ermöglicht ausschließlich die Darstellung sekundärer Veränderungen, wie z.B. der Osteophytenbildung, aber keineswegs eine frühe Erkennung von Knorpelschäden oder Veränderungen anderer artikulärer Strukturen, da diese im Röntgen nicht sichtbar sind. Diese Weichteilveränderungen stellen jedoch den Beginn der Erkrankung dar und entstehen lange bevor knöcherne Veränderungen sichtbar werden (INNES et al., 2004; POWNDER et al., 2018).

Eine weitaus sensitivere Methode, vor allem auch die Weichgewebe betreffend, ist die Magnetresonanztomographie (MRT). Die MRT misst elektromagnetische Signale, die von der kohärenten Präzession angeregter Wasserstoffkerne im Magnetfeld stammen. Mithilfe eines Magnetfeldes und Hochfrequenzpulsen können Datensätze erzeugt werden, die für die 2- und 3-dimensionale Darstellung anatomischer Strukturen genutzt werden (BIEDERER, 2005). Sie ermöglicht es, ohne die Anwendung ionisierender Strahlen, Aufnahmen anatomischer Strukturen mit hohem Weichteilkontrast anzufertigen (BIEDERER, 2005; BRÜHSCHWEIN et al., 2018). Nachteilig in Bezug auf die klinische Anwendung sind sehr hohe Investitionskosten anzusprechen, die sich aus den Anschaffungs-, Wartungs- und Personalkosten ergeben. Hinzukommt der zeitliche Faktor, da die Untersuchungszeiten schnell länger als 30 Minuten sein können und die untersuchten Patienten zur Verhinderung von Bewegungsartefakten außerdem narkotisiert werden müssen (Biederer 2005, Brühschwein et al. 2018).

Diese nicht-invasive bildgebende Technik ist hinsichtlich der Diagnostik von Erkrankungen des Kniegelenkes vor allem in der Humanmedizin als sinnvolle Methode etabliert (BANJAR et al., 2022). Die klassische, qualitative MRT ermöglicht eine adäquate Beurteilung der Gelenkinnenstrukturen, wie z.B. dem Gelenkknorpel, der Kreuzbänder und den Menisken.

Diese konventionelle MRT ermöglicht in der Regel nur eine qualitative Beurteilung untersuchter Strukturen und hat daher (dieses Wort konnte ich leider nicht lesen) Limitationen. Mit diesen MRT-Untersuchungen können aktuell nur Degenerationen

detektiert werden, die bereits zu morphologischen Veränderungen geführt haben (BANJAR et al., 2022). Dazu gehören beispielsweise Risse des Meniskus oder Abnutzungserscheinungen, die zu einem Substanzverlust des gesamten Meniskus führen. Außerdem ist die Beurteilung von Strukturen wie beispielsweise dem Knorpel aufgrund eingeschränkter räumlicher Auflösung begrenzt. Das bedeutet somit, dass auch die qualitative MRT limitiert darin ist, frühe strukturelle Veränderungen des Gewebes aufzuzeigen, bevor morphologische Auffälligkeiten sichtbar werden (BANJAR et al., 2022).

Eine dahingehend sensitivere Methode ist die semi-quantitative MR-Bildgebung. Hier finden zunehmend Sequenzen zur quantitativen und volumetrischen Beurteilung synovialer Strukturen Anwendung (CHU et al., 2012). Beispiele für solche Sequenzen sind unter anderem das „T2-Mapping“, „Natrium-MRI“, „Diffusion-weighted-imaging“, „ultrashort TE“ und „glycosaminoglycan specific chemical exchange saturation transfer (gagCEST)“ (BANJAR et al., 2022). Diese Sequenzen bzw. Kontraste können Informationen über die histologische bzw. mikrostrukturelle Zusammensetzung der Gewebe liefern, bevor klassische bildgebende bzw. morphologische Veränderungen auftreten. Grundlage dessen, sind Veränderungen in der biochemischen Zusammensetzung des zu untersuchenden Gewebes (HOFMANN et al., 2018). Im Rahmen der Gelenksdegeneration auftretende Veränderungen der Menisken spielen sich vor allem im Bereich der extrazellulären Matrix ab. Beispiele dafür sind unter anderem ein veränderter Wassergehalt, eine veränderte Kollagenstruktur und Veränderungen im Proteoglykangehalt (MCDEVITT u. WEBBER, 1990).

Aktuelle Studien zeigen, dass die T2-Relaxationszeit beispielsweise ein gutes Potential aufweist, als Biomarker für frühe Degenerationen des Meniskusgewebes und des Gelenkknorpels zu fungieren (RAUSCHER et al., 2008; BAUM et al., 2013; ARNO et al., 2016; WANG et al., 2016; NEBELUNG et al., 2016). Dabei geht es vor allem um die Detektion der veränderten mikrostrukturellen Zusammensetzung, wie beispielsweise Veränderungen im Kollagengehalt, Proteoglykangehalt oder der Kollagenorganisation (ROUGHLEY u. LEE, 1994; DIJKGRAAF et al., 1995; BAUM et al., 2013; NEBELUNG et al., 2016; POWNDER et al., 2018; EIJGENRAAM et al., 2019).

Die T2-Relaxationszeit kann den Hydratationsstatus untersuchter Gewebe widerspiegeln und den Gehalt und die Integration der Wassermoleküle (LIESS et al., 2002; MOSHER u. DARDZINSKI, 2004; HONTOIR et al., 2015). Dies beruht auf Unterschieden in der Beweglichkeit der Wasserstoff-Atome, was wiederum Auswirkungen auf die Spin-Spin-Interaktionen hat. Grundsätzlich hat man eine geringere Beweglichkeit der Wassermoleküle, wenn sie in der extrazellulären Matrix gebunden sind. Da es im Rahmen

osteoarthrotischer Veränderungen immer auch zu Veränderungen im Wassergehalt kommt, kann die T2-Relaxationszeit frühzeitig erste Veränderungen detektieren (HONTOIR et al., 2015). Einige Autoren haben bereits die Anwendung der T2-Relaxationszeit zur Untersuchung von Menisken überprüft und aus ihren Ergebnissen geschlossen, dass dieser Parameter ein guter Biomarker sein könnte (RAUSCHER et al., 2008; ZARINS et al., 2010; MITTAL et al., 2019).

Ein weiterer Parameter ist die T2\*-Relaxation. T2\* ermöglicht kürzere Aufnahmezeiten als T2. T2 und T2\* verhalten sich in einigen Bereichen etwas unterschiedlich. Gleich ist die verlängerte Relaxationszeit bei höherem Wassergehalt im Gewebe. Dies tritt beispielsweise bei Ödemen auf. Während T2 jedoch sensitiver bezüglich des Hydratationsstatus des untersuchten Gewebes ist, ist T2\* sehr sensitiv bezüglich des Kollagennetzwerkes (TOGAO et al., 2018; ZENG et al., 2019). T2\* weist eine deutliche Verkürzung der Relaxationszeit auf bei vorliegender Inhomogenität der magnetischen Eigenschaften des untersuchten Gewebes, beispielsweise bei Eisenablagerungen. Diese Veränderung in der Relaxationszeit könnte die Detektion von Gewebeveränderungen im Rahmen degenerativer Prozesse ermöglichen.

Da sich Inhomogenitäten des Magnetfeldes hier stärker auswirken, müssen aufgenommene Daten jedoch mit Vorsicht betrachtet bzw. interpretiert werden (HONTOIR et al., 2015). In der Humanmedizin wurde dieser Parameter schon einige Male zur Untersuchung von Knie- und Hüftgelenken angewandt (WELSCH et al., 2008; MAMISCH et al., 2012; NEBELUNG et al., 2016). Aktuell gibt es kaum Studien zur Anwendung der T2\*-Relaxationszeit für die Untersuchung von Gelenken bei Tieren. Powder et al. (2018) untersuchten canine Menisken mittels T2\*-Relaxationszeit und verglichen die Resultate mit den Ergebnissen der histologischen Untersuchung. Lee et al. (2023) haben in vivo die Kontaktbelastung des Gelenkknorpels vor und nach einseitiger Resektionen der Sehne des M. supraspinatus gemessen und eine positive Korrelation zwischen Kontaktbelastung und T2\*-Relaxationszeit festgestellt (LEE et al., 2023).

Die T1-Relaxationszeit beschreibt den Energieaustausch zwischen den Spins der Protonen und der molekularen Umgebung (Gitter) (MITTAL et al., 2019). Sie ist somit ebenfalls sensitiv für den Wassergehalt im Gewebe und fand bisher primär Anwendung zur Beurteilung von Gelenkknorpel und Weichteilgewebe (REGATTE et al., 2004; LI et al., 2005; BRANDT et al., 2006; MITTAL et al., 2019). Die Anwendung der T1-Relaxationszeit zur Beurteilung des Faserknorpels der Menisken wird aktuell auch bereits untersucht (Mittal et al. 2019).

Der Magnetisierungstransfer (MT) ist ein weiteres Verfahren in der MR-Bildgebung, das insbesondere die Darstellung makromolekularer Strukturen ermöglicht. Er stellt somit eine weitere Option für die Abbildung von Makromolekülen dar (GRAY et al., 1995; LI et al., 2010). Dabei wird die Veränderung der Magnetisierung des freien Wassers vor und nach Anwendung eines speziellen Sättigungspulses erfasst (ZHANG et al., 2021). Der Ansatz nutzt die Wechselwirkung zwischen Protonen freier Wassermoleküle und Protonen, die an Makromoleküle gebunden sind. Durch selektive Sättigung der gebundenen Protonen wird die Magnetisierung auf die freien Wasserprotonen übertragen. Dies führt zu einer Verringerung der Signalintensität, welche durch die sogenannte Magnetisierungstransfer-Ratio (MTR) quantifiziert werden kann (ZHANG et al., 2021).

Dieser Parameter findet in der Tiermedizin bisher aber kaum Anwendung. In der Humanmedizin hingegen wird der MT bisher vor allem zur Untersuchung des Gehirns und des Rückenmarks, insbesondere zur Beurteilung der Myelinisierung und der weißen Substanz, im Rahmen der multiplen Sklerose genutzt (MEHTA et al., 1995; ROPELE u. FAZEKAS, 2009). Für die Untersuchung des muskuloskeletalen Systems gibt es nur wenige Veröffentlichungen. Einige Studien zeigen allerdings einen Zusammenhang zwischen diesem Parameter und einem geringeren Kollagen- und Proteoglykan-Gehalt im Gelenkknorpel (REGATTE et al., 2004; LI et al., 2010; ZHANG et al., 2021). Zhang et al. (2021) untersuchte Meniskusgewebe von Patienten mit und ohne Osteoarthritis mithilfe des MT. Sie konnten unter anderem niedrigere Werte der MTR für Menisken von Patienten mit Osteoarthritis nachweisen und eine negative Korrelation dieser Werte mit dem Alter feststellen.

Die im Rahmen des MT häufiger eingesetzte MTR hat gewisse Nachteile. Sie ist insgesamt eher unspezifisch, da sie von verschiedenen Faktoren beeinflusst wird. Gewebeveränderungen, wie beispielsweise Ödeme, können sie genauso beeinflussen, wie Magnetfeldinhomogenitäten oder Unterschiede in den Aufnahmeparametern. Aufgrund dessen wurde zur Verbesserung der Objektivität der quantitative Magnetisierungstransfer (qMT) entwickelt. Diese Technik liefert grundsätzlich spezifischere Parameter, da sie z.B. weniger stark von veränderten Aufnahmeparametern beeinflusst wird. Sie erfordert aber häufig lange Aquisitionszeiten und eine sehr aufwendige Datenverarbeitung. Aus diesen Gründen ist die klinische Anwendung noch sehr limitiert.

Eine klinische Anwendungsform, die auf dem MT beruht, ist die sog. MTsat. Eine Technik, die von (HELMS et al., 2008) eingeführt wurde und einen Kompromiss zwischen der MTR und der aufwendigen qMT darstellt. Aufgrund von Korrekturen für B1-Inhomogenitäten und der T1-Relaxationszeit werden für diese Technik kürzere Aquisitionszeiten als für die qMT

benötigt, was den klinischen Einsatz deutlich verbessert. MTsat stellt den Anteil des freien Wassers dar, das über einen einzelnen Magnetisierungstransferimpuls während der Repititionszeit gesättigt wird. Mittels MTsat werden aktuell primär neurologische Erkrankungen untersucht. Beispielsweise konnten mikrostrukturelle Veränderungen von Rückenmark und Gehirn detektiert werden, die bei subakuten Rückenmarksverletzungen oder auch im Rahmen der multiplen Sklerose auftreten (WEISKOPF et al., 2013a; GRABHER et al., 2015; LEMA et al., 2017; LEUTRITZ et al., 2020b). Eine Untersuchung muskuloskeletaler Strukturen ist uns bisher nicht bekannt.

Grundsätzlich fokussieren sich die meisten vorangegangenen Studien, die semi-quantitative MR-Parameter nutzten, auf die Untersuchung von humanen Menisken bzw. humanem Gelenkknorpel. Nach aktuellem Stand gibt es nur eine Studie, die canine Menisken histologisch und mittels semi-quantitativen MRT untersucht hat (POWNDER et al., 2018). In dieser Studie wurden Normalwerte für T2\* für canine Menisken beschrieben. Die Autoren konnten zeigen, dass das Hinterhorn des medialen Meniskus signifikant längere T2\*-Werte im Vergleich zu anderen Meniskusanteilen aufweist.

In unserer *ex vivo* Studie soll die Eignung verschiedener semi-quantitativer MR-Parameter zur Beurteilung mikrostruktureller Meniskusveränderungen untersucht werden. Es fanden die T1-, T2-, T2\*-Relaxationszeiten und sowohl MTR als auch MTsat Anwendung. Untersucht werden die Kniegelenksmenisken älterer Hunde zwischen 15 und 30 kg, welche laut Anamnese und klinischer Untersuchung keine Kniegelenksinstabilität bzw. Lahmheit aufwiesen. Ziel ist es, zu überprüfen, inwieweit diese Parameter als frühzeitige Biomarker fungieren und bereits milde histologische Veränderungen der Menisken detektieren können.

# Histological Findings and T2 Relaxation Time in canine Menisci of Elderly Dogs – An Ex Vivo Study in Stifle Joints

Lena Bunzendahl <sup>1\*</sup>, Amir Moussavi <sup>2</sup>, Martina Bleyer <sup>3</sup>, Jana Dehnert <sup>2</sup>, Susann Boretius <sup>2</sup> and Stephan Neumann <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Small Animal Clinic, Institute of Veterinary Medicine, Georg-August University of Göttingen, 37077 Göttingen, Germany; lena.bunzendahl@uni-goettingen.de

<sup>2</sup>Functional Imaging Laboratory, German Primate Center, Leibniz Institute for Primate Research, 37077 Göttingen, Germany; amoussavi@dpz.eu

<sup>3</sup>Pathology Unit, German Primate Center, 37077 Göttingen, Germany; mbleyer@dpz.eu

Veterinary Science

Special issue: Joint disease in companion animals

(Journal impact factor: 2,518)

Volume 10, Date 2023, Article

DOI: 10.3390/vetsci10030182

Accepted on February 15<sup>th</sup> 2023

**Simple Summary:** Osteoarthritis is a common disease in dogs, most often affecting the stifle joint and causing damage to all joint structures. Detecting early stages of osteoarthritis is important for an effective treatment. Conventional magnetic resonance imaging (MRI) is the golden standard imaging technique for diagnosing pathologies of soft tissues in the stifle joint. However, it is limited to the visualization of macroscopic tissue pathology. In contrast, quantitative MRI offers a more sensitive method for diagnosing early pathological changes, as it enables the detection of microstructural processes. The menisci play an important role in joint health. They undergo structural changes in osteoarthritis, including alterations in water content and collagen structures, as well as deviations in proteoglycan content. Different studies have shown the potential of special MRI sequences to identify these changes, e.g., T2 relaxation time. In this study, canine menisci of elderly dogs without clinical evidence of hindlimb lameness were examined histologically and using MRI. Our results showed that clinically healthy elderly dogs exhibited slight histological, probably age-related, degenerative changes in the menisci, but did not reveal significant radiological evidence of chronic inflammatory and degenerative changes, including no significant changes in T2 relaxation time.

**Abstract:** Osteoarthritis is a chronic disease that often affects the canine stifle joint. Due to their biomechanical function, the menisci in the canine stifle play an important role in osteoarthritis. They compensate for the incongruence in the joint and distribute and minimize compressive loads, protecting the hyaline articular cartilage from damage. Meniscal degeneration favors the development and progression of stifle joint osteoarthritis. Qualitative magnetic resonance imaging (MRI) is the current golden standard for detecting meniscal changes, but it has limitations in detecting early signs of meniscal degeneration. A quantitative MRI offers new options for detecting early structural changes. T2 mapping can especially visualize structural changes such as altered collagen structures and water content, as well as deviations in proteoglycan content. This study evaluated T2 mapping and performed a histological scoring of menisci in elderly dogs that had no or only low radiographic osteoarthritis grades. A total of 16 stifles from 8 older dogs of different sex and breed underwent ex vivo magnet resonance imaging, including a T2 mapping pulse sequence with multiple echoes. A histological analysis of corresponding menisci was performed using a modified scoring system. The mean T2 relaxation time was 18.2 ms and the mean histological score was 4.25. Descriptive statistics did not reveal a correlation between T2 relaxation time and histological score. Ex vivo T2 mapping of canine menisci did not demonstrate histological changes, suggesting that early meniscal degeneration can be present in the absence of radiological signs of osteoarthritis, including no significant changes in T2 relaxation time.

**Keywords:** osteoarthritis; canine; menisci; stifle; magnetic resonance imaging; functional imaging; T2; histological score; meniscal degeneration

## 1. Introduction

Osteoarthritis is a chronic progressive disease that leads to changes in all joint compartments. It is currently incurable and causes irreversible damage to the affected joint. In particular, the stifle joint, as a complex synovial joint, is frequently affected in both humans and dogs. In dogs, osteoarthritis of the stifle joint mainly occurs in cases of ruptured cranial cruciate ligament and patellar luxation [1]. Due to its chronic and progressive character, osteoarthritis causes severe pain and significant restrictions on quality of life.

The menisci in stifle osteoarthritis have two pathogenetic roles. These meniscal tears can both be a consequence of osteoarthritis and can also contribute to its development [2–4]. Therefore, the menisci

are the object of this current research, which focuses on the pathogenesis and mechanisms of osteoarthritis.

The menisci of the stifle joint are tangerine-shaped fibrocartilage discs located on the medial and lateral sides of the tibial plateau. They have important functions in the biomechanics of the stifle joint. They compensate for the incongruence in the joint and distribute and minimize compressive loads so that the hyaline articular cartilage is protected from damage [5, 6]. Therefore, the menisci enable physiological motion in the stifle joint and protect the joint from impact and compressive loads. Intact menisci are therefore a fundamental requirement for the long-term maintenance of stifle joint health [7]. In the context of osteoarthritis, morphological, biomechanical and molecular changes occur in all joint compartments, including the menisci. An objective assessment of the structure and composition of the meniscal tissue can be an important prognostic marker with regard to the detection of early changes in the joint. Particularly in patients at risk of osteoarthritis, early detection and therapeutic intervention decelerate disease progression [7, 8]. Magnetic resonance imaging (MRI) has become the diagnostic modality of choice for detecting intra-articular abnormalities in the stifle joint [9]. Conventional qualitative MRI scans are limited to the detection of degeneration that results in macroscopic morphological changes [10–12]. These include, for example, tears of the meniscus or signs of degeneration that lead to a loss of substance in the entire meniscus. In contrast, quantitative MRI represents a different method in this research field, as it detects structural changes in the biochemical composition of affected organs [11]. Changes in the menisci that occur in the course of degenerative joint changes primarily take place in the extracellular matrix and consist of altered water contents, altered collagen structures and deviations in proteoglycan contents. These changes can be detected, for example, using T2 relaxation time [10, 13]. Recent studies have shown that T2 relaxation time has the potential to serve as a biomarker for early degeneration of meniscal tissue [10, 13–16]. Previous studies have focused on human menisci. To our knowledge, validation of *ex vivo* T2 mapping in canine menisci has not been performed yet. This study evaluated histological degenerations in menisci of elderly lame dogs that had no or mild radiological signs of osteoarthritis. A radiological evaluation was performed using conventional X-rays and MRIs, including T2 mapping of the medial and lateral menisci.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1. Study Population*

For this study, 16 stifle joints of 8 older dogs (aged between 10 and 17 years) of both sexes from different breeds were examined. The body weight varied from 15 to 30 kg and body condition scores

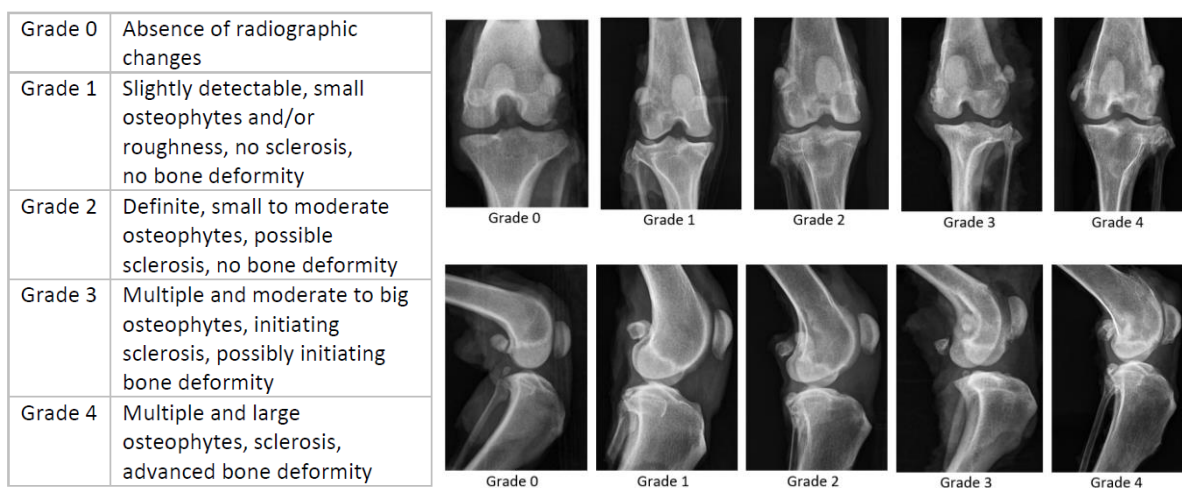
(BCS) ranged from 4 to 7. We included 1 “Labrador Retriever”, 1 “Deutsche Wachtel”, 1 “Bayerischer Gebirgsschweißhund”, 1 “Boxer” and 4 “mixed-breed dogs”. We only examined stifle joints from dogs that were euthanized at the small animal clinic of the Institute of Veterinary Medicine, Georg-August University of Göttingen, from 2019 to 2022, for reasons unrelated to this study. There was no evidence of existing hindlimb lameness in their medical history and no signs of instability in their stifle joints.

## 2.2. Sample Preparation

After they were euthanized, the dogs were stored in a cold room at 8 °C. The stifle joints were dissected from surrounding soft tissue no later than 24 h *post mortem* and placed in a container filled with 10% neutral-buffered formaldehyde. In addition, depending on the size of the joint, 1–2 mL of the formaldehyde solution was injected into the joint to fix intraarticular structures as efficiently as possible. During the intra-articular injection, strict care was taken not to introduce any air into the joint.

## 2.3. X-ray Grading

The dissected joints were radiographed in medio-lateral and cranio-caudal beam paths. Radiographic assessment of the degree of osteoarthritis was performed using a modified Kellgren-Lawrence grading system [17]. Definition of osteoarthritis grade and exemplary pictures for each grade are illustrated in figure 1. Only dogs with no or mild radiographic evidence of osteoarthritis were included in the study.



**Figure 1.** Modified radiographic osteoarthritis grading system for dogs [17] according to Kellgren-Lawrence system [18] and exemplary pictures for each osteoarthritis grade.

## 2.4. MR imaging

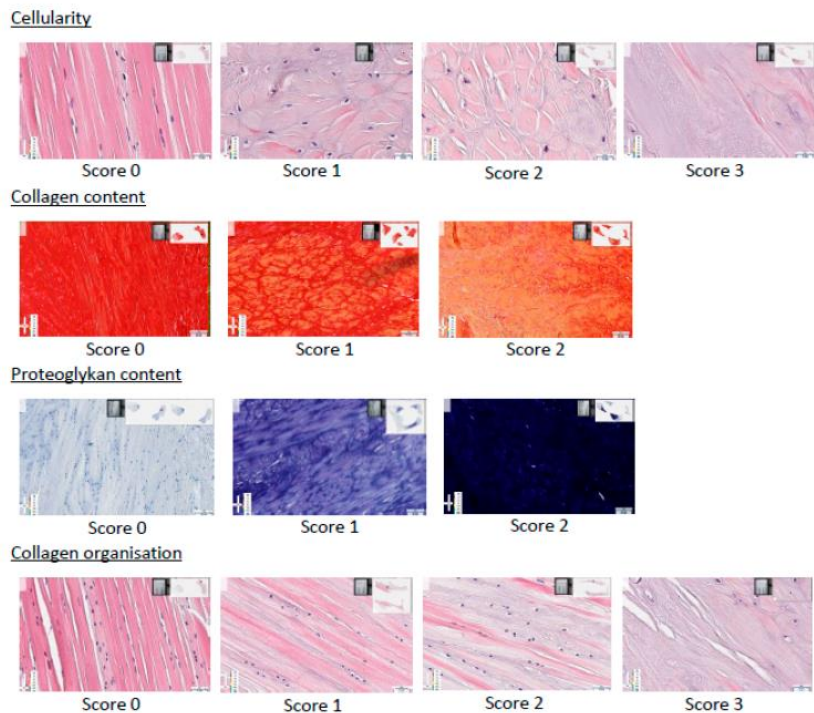
Formalin fixed joints were examined with 3 T whole-body MRI (MAGNETOMPrisma, Siemens Healthineers, Erlangen, Germany) with a maximum gradient strength of 80 mT/m. Images were acquired with a 16-channel coil (Variety, NORAS MRI products GmbH, Höchberg, Germany) in which the container with the joint was fixed. The MR imaging protocol included T2-weighted sequences in sagittal, coronal and axial plane. For slice positioning, low-resolution gradient echo images were acquired in three orientations (axial, sagittal, coronal). Afterwards, sagittal 2D multi-echo spin-echo images (TR= 7000 ms, TE = nx13.5 ms, 12 echoes, spatial resolution =  $0.32 \times 0.32 \text{ mm}^2$ , field of view =  $144 \times 144 \text{ mm}^2$ , slice thickness = 0.9 mm, 48 slices, pixel bandwidth = 310 Hz/Px) were acquired and maps of T2 relaxation times were calculated by using an in-house pixelwise mono-exponential fitting routine that ignores the first echo time (Matlab, R2021a, MathWorks, Natick, USA).

For the medial and lateral meniscus, a region-of-interest (ROI) was manually drawn in each image dataset using the program "ITK-Snap". The segmentation was based on the T2 weighted sequence, which provides the best possible contrast between menisci and surrounding tissue. There were two ROIs per joint, the medial and lateral meniscus.

## *2.5. Histology*

After MRI measurements, menisci were prepared for histological examination. Medial and lateral menisci were harvested from each joint and sectioned longitudinally to allow assessment of the anterior and posterior horns as well as the middle part. The obtained samples were again fixed in 10% neutral buffered formaldehyde, embedded in paraffin and sectioned at approximately 4  $\mu\text{m}$ . Sections were stained with hematoxylin-eosin (H&E) to provide an overview and for evaluation of cellularity and collagen organization. In addition, qualitative assessment of collagen content was performed using picosirius red staining [19-21] (according to Sun et al. 2011) and qualitative assessment of proteoglycan content was performed using toluidine blue staining (according to Sun et al. 2011). For picosirius red, a staining kit from SkyTek Laboratories was used (SkyTek Laboratories, Inc. 205 South 600 West, Logan, UT 84321, U.S.A.). Aqueous toluidine blue stain was performed according to a standard protocol [22]. Visualization of stained sections was performed using digital microscopy. Samples were scanned by the Aperio CS2 eSlide Scanscope (Leica Biosystems, Nussloch, Germany) and viewed with Aperio eSlide Manager. Histological evaluation was based on a modified scoring adapted from Sun et al. 2011 [23] and Pauli et al. 2011 [24] (Figure 2). One slice for each meniscus and each stain was evaluated. After evaluating the menisci a total score was created by adding the scores of each category. Maximum of total score 10 corresponded to maximal degree of degeneration.

<p><b>Cellularity</b> Pauli et al., 2011</p> <p>normal (score 0)</p> <p>diffuse hypercellularity (score 1)</p> <p>diffuse hypo/acellular regions (score 2)</p> <p>hypocellularity (empty lacuna, pyknotic cells) (score 3)</p>
<p><b>Collagen content</b> Sun et al., 2012</p> <p>strong red staining (score 0)</p> <p>moderate red staining (score 1)</p> <p>weak red staining (score 2)</p>
<p><b>Proteoglycan content</b> Sun et al., 2012</p> <p>minimal blue staining (score 0)</p> <p>weak blue staining (score 1)</p> <p>strong blue staining (score 2)</p>
<p><b>Collagen organisation</b> Pauli et al., 2011</p> <p>collagen fibers organized, homogenous eosinophilic staining of extracellular matrix (score 0)</p> <p>collagen fibers organized, diffuse foci of hyaline or mucinous degeneration (score 1)</p> <p>collagen fibers unorganized, confluent foci or bands of hyaline or mucinous degeneration, fraying (score 2)</p> <p>collagen fibers unorganized, fibrocartilaginous separation (edema, cyst formation), severe fraying and tears (score 3)</p>
<p><b>Total score</b></p> <p>(max. score 10)</p>



**Figure 2.** Modified histological scoring system according to Sun et al. [23] and Pauli et al. [24].

All samples were independently evaluated by two examiners with different levels of experience. In case of questionable results, the assessment was re-performed together so that a consensus could be reached.

## 2.6. Statistical Analysis

We performed a descriptive statistical analysis. Histological findings and T2 values were described for medial and lateral menisci in all patients.

## 3. Results

### 3.1. Study Population

In this study, a total of 32 menisci, 16 medial and 16 lateral, from 16 canine stifle joints of 8 dogs were examined. The joints were from dogs of different breeds, male and female. Detailed information about the dogs is shown in Table 1.

**Table 1.** Information about study population

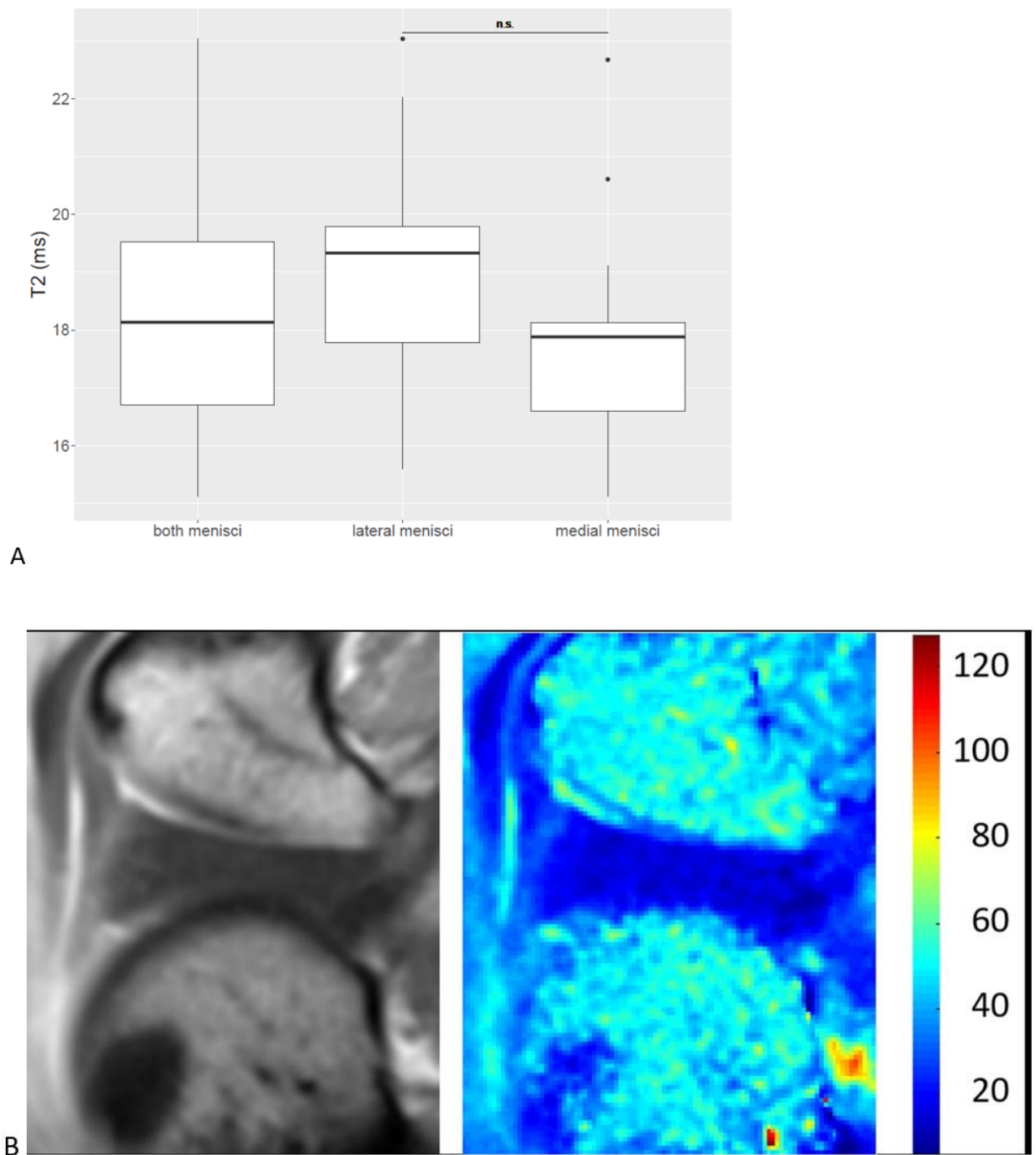
Number of menisci	32
Number of patients	8
Median age	13
Mean age	12.94
Range (age)	10–17
Median body weight	27.5
Mean body weight	25.5
Range (body weight)	20–30
Median BCS	6
Mean BCS	6
Range (BCS)	4–7
Female (neutered)	4
Male	3
Female	1

### 3.2. Radiographic Osteoarthritis Score

Overall, 12 out of 16 (75%) of the included joints had mild radiographic signs of osteoarthritis, corresponding to Kellgren–Lawrence grade 1. The four other joints (25%) had no evidence of osteoarthritis, classifying as grade 0.

### 3.3. T2 Relaxation Time in Meniscal Tissue

The mean T2 relaxation time was 18.3 ms (range 15.1–23). In medial menisci, the mean T2 relaxation time was 17.7 ms (range 15.1–22.7), while it was 19.0 ms (range 15.6–23) in lateral menisci. There was no significant correlation between T2 values and age, body weight or body condition score (BCS). Representative findings of T2 mapping are displayed in Figure 3. The paired t-test showed no significant difference between medial and lateral menisci ( $p = 0.13$ ).



**Figure 3.** (A) Meniscal T2 values in both medial and lateral menisci. There was no significant difference between medial and lateral menisci ( $p = 0.13$ ). (B) Sagittal magnitude image of a stifle joint and corresponding T2 map. Color chart on the right side represents T2 relaxation times in ms.

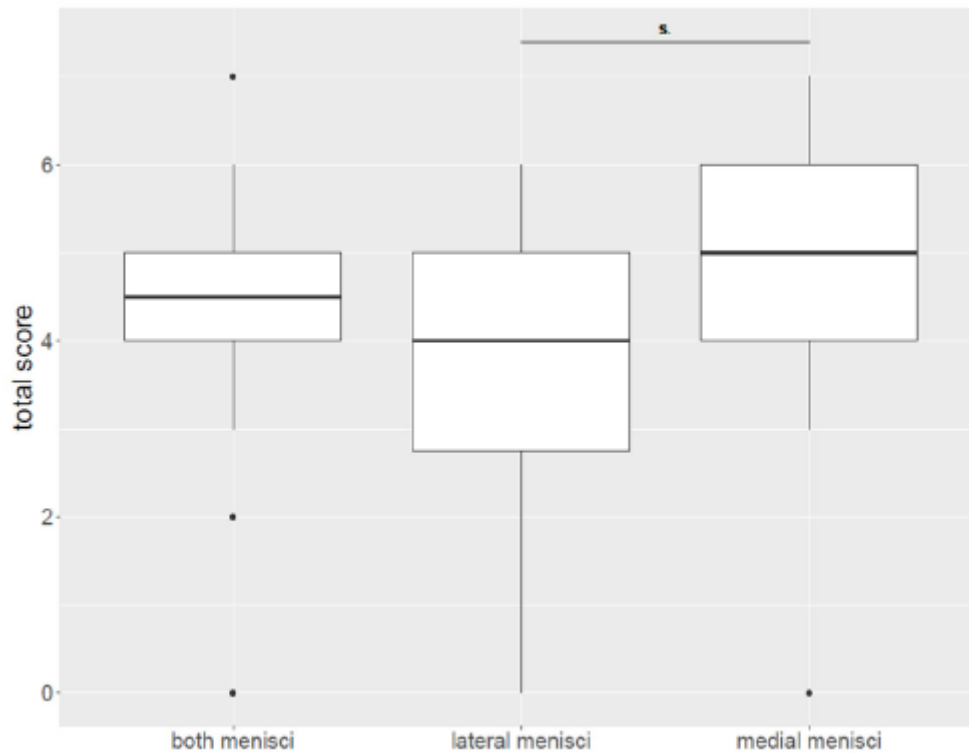
### 3.4. Histological Findings

All 32 menisci were examined histologically using the three different stains. An evaluation of degeneration showed an overall mean histological score of 4.25. Medial menisci had a mean score of 4.75 and lateral menisci had a mean score of 3.75. The histological score details for the total score are

shown in Figure 4. The paired *t*-test showed a significant difference between medial and lateral menisci ( $p = 0.006$ ). The content of collagen and proteoglycans varied from score 0 to 2. The collagen organization varied from score 0 to 3 and cellularity showed a degeneration score between 0 and 2. Detailed results of each histological score are presented in Tables 2–4 and Figure 5. There was no significant correlation between total histological score, collagen content, proteoglycan content, cellularity, collagen organization and age, weight or BCS.

**Table 2.** Statistical values of total histological score for medial and lateral menisci.

<b>Total score (all menisci)</b>	
Median	4.5
Mean	4.25
Range	0–7
<b>Total score (medial menisci)</b>	
Median	5
Mean	4.75
Range	0–7
<b>Total score (lateral menisci)</b>	
Median	4
Mean	3.75
Range	0–6



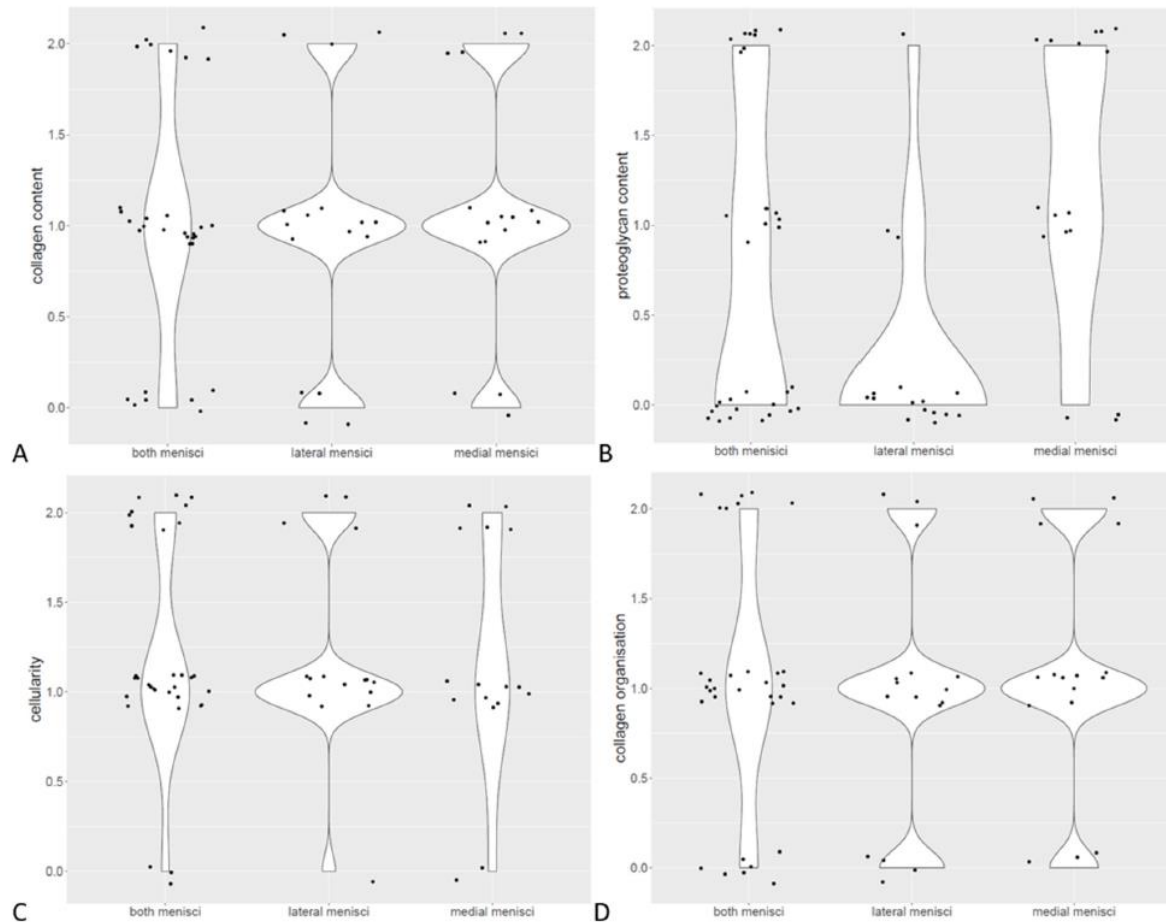
**Figure 4.** Total histological degeneration score in medial and lateral menisci. There was a significant higher degeneration score in medial than in lateral menisci ( $p=0.006$ ).

**Table 3.** Percentage distribution of total histological score for medial and lateral menisci.

Total Score	Medial Menisci	Lateral Menisci
Score 0	6.25%	6.25%
Score 1	-	-
Score 2	-	18.75%
Score 3	6.25%	6.25%
Score 4	25%	31.25%
Score 5	31.25%	31.25%
Score 6	18.75%	6.25%
Score 7	12.5%	-
Score 8	-	-
Score 9	-	-
Score 10	-	-

**Table 4.** Percentage distribution of scoring of collagen content in medial and lateral menisci.

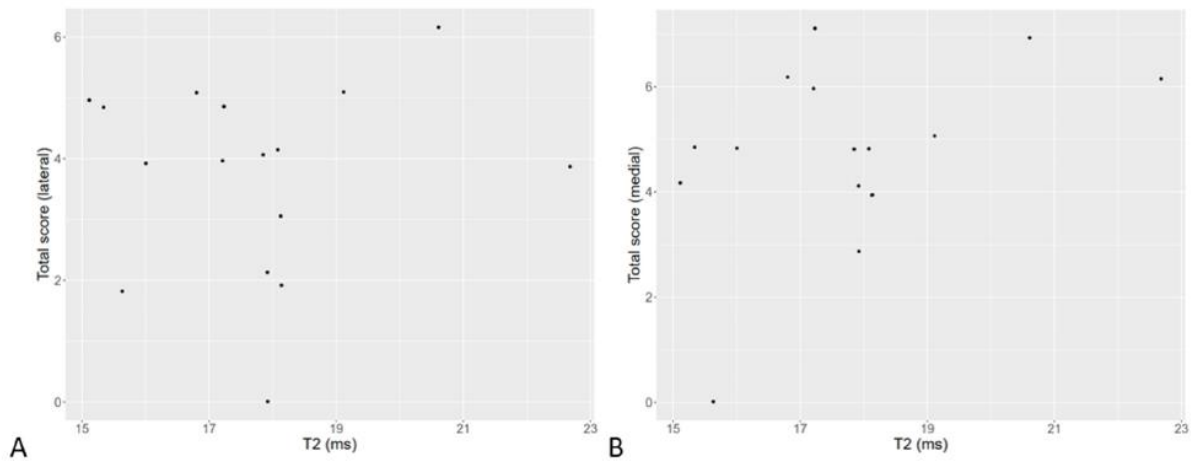
<b>Scoring of collagen content</b>	<b>Medial menisci</b>	<b>Lateral menisci</b>
Score 0	18.75%	25%
Score 1	56.25%	56.25%
Score 2	25%	18.75%
<b>Scoring of proteoglycan content</b>	<b>Medial menisci</b>	<b>Lateral menisci</b>
Score 0	18.75%	81.25%
Score 1	37.5%	12.5%
Score 2	43.75%	6.25%
<b>Scoring of cellularity</b>	<b>Medial menisci</b>	<b>Lateral menisci</b>
Score 0	12.5%	6.25%
Score 1	56.25%	68.75%
Score 2	31.25	25%
Score 3	-	-
<b>Scoring of collagen organization</b>	<b>Medial menisci</b>	<b>Lateral menisci</b>
Score 0	6.25%	6.25%
Score 1	75%	56.25%
Score 2	18.75%	31.25
Score 3	-	6.25%



**Figure 5.** Scoring of collagen content showed no significant differences between medial and lateral menisci(A). Scoring of proteoglycan content showed higher score in lateral menisci(B). Scoring of cellularity showed no significant differences between medial and lateral menisci(C). Scoring of collagen organisation showed no significant differences between medial and lateral menisci(D).

### 3.5. T2 Relaxation Time and Histological Findings

There was no significant correlation between histological findings and T2 relaxation time in the examined menisci. The potential correlation was examined for T2 relaxation time and total score, collagen content, proteoglycan content, cellularity and collagen organization. Detailed results for the T2 values and total histological score are shown in Figure 6.



**Figure 6.** T2 relaxation time versus total histological score in lateral (A) and medial (B) menisci. There was no significant correlation between T2 values and histological scores.

## 5. Discussion

This study was conducted to assess the presence and extent of histological degeneration of menisci in older lame dogs. Only dogs with low-grade radiographic stifle osteoarthritis were included. Our results demonstrated that there were distinct histological signs of degeneration in the studied menisci, even if there were no obvious signs of osteoarthritis in imaging modalities. These findings suggest that there can be different degrees of degeneration in the menisci of older dogs before clinical signs of lameness or radiographic evidence of osteoarthritis develop. Meniscal degeneration has been studied in dogs before, but only a minority of these studies performed both histological and magnetic resonance imaging (MRI) [25–27]. Collagen fibers and proteoglycans are important components of the meniscal extracellular matrix. Changes in their composition can have a strong impact on the mechanical strength of the meniscus. For example, collagen content in osteoarthritic menisci decrease while the disorganization of collagen fibers increase. Additionally, the content of collagen decreases in osteoarthritic menisci, which causes a diminution of mechanical strength. In human menisci, a reduced content of collagen and proteoglycans has been described in the context of degeneration [13, 23, 28, 29]. Others reported a decrease in collagen content, but an increase in proteoglycan content in osteoarthritic menisci [23]. There are some studies, however, that have examined quantitative MRI, such as T2 mapping, as a biomarker for meniscal or cartilage degeneration [1, 30–35]. Histological grading has not been performed regularly, but most studies demonstrated that T2 mapping can differentiate between healthy patients and patients with osteoarthritis. Mittal et al. [35] demonstrated that T2 mapping reflects changes in the biochemical composition of menisci. The authors suggested that T2 values are sensitive to interactions between water molecules and the collagen network, but cannot reflect changes in proteoglycan content [35]. Zarins et al. [34] showed that T2 measurements can be a non-invasive technique to detect and quantify meniscal degeneration. Among other imaging

parameters, Rauscher et al. [15] evaluated T2 mapping in menisci of patients with varying degrees of osteoarthritis and compared the results with those of a healthy control group. They found that meniscal T2 values correlated with clinical signs of osteoarthritis, thereby distinguishing between healthy patients and patients with mild to severe meniscal degeneration. They also concluded that T2 mapping might be more useful than other imaging parameters for differentiating between the investigated groups [15]. In addition to osteoarthritis patients, quantitative MRI measurements were carried out on patients with acute stifle injury. Wang et al. [14] reported a significant increase in meniscal T2 values in these patients. Even in patients without morphological changes, values were higher than those of the healthy control group [14].

Eijgenraam et al. [30] were the first to correlate meniscal T2 mapping with histological grading as the reference standard, while the imaging was performed *in vivo*. Nebelung et al. [16] performed a comprehensive validation study for multiple quantitative MRI parameters, using histological grading as the reference standard. In contrast to Eijgenraam et al. [30], they performed the imaging *ex vivo*. It must be considered that all the aforementioned studies were performed on human patients. The present study is, therefore, one of the first to examine canine menisci with quantitative MRI, using histological scoring as the reference standard. Comparisons with other studies must be viewed critically as there are differences between humans and dogs. Additionally, some studies were performed *ex vivo* and others *in vivo*. It is questionable as to whether or not the T2 measurements obtained *ex vivo* reflect the *in vivo* situation [30].

Several factors can influence T2 values in an *ex vivo* study. First of all, the temperature is different during the measurement. In *in vivo* measurements, joints have body temperature, whereas *ex vivo* measurements take place at room temperature. Differences in temperature can cause changes in signal intensity. In addition, quantitative *ex vivo* MRI experiments usually have different acquisition parameters. For example, the number and duration of echo times, acquisition matrix and field of view may vary when compared to an *in vivo* study [16, 36]. Another relevant parameter is sample storage. Samples in an *ex vivo* study are usually fixed in formalin, which influences the hydration state of the tissue and can, therefore, have a considerable impact on the imaging values [16, 37].

As shown in other studies and also demonstrated in our results, it can be difficult to detect differences in T2 mapping between patients with no and only mild signs of osteoarthritis [34]. However, Wang et al. found significantly higher T2 values in acutely injured stifles (in the case of a ruptured cranial cruciate ligament) compared to healthy subjects [14].

T2 mapping of the menisci can be challenging with regard to the heterogeneity of meniscal tissue [38–40]. In previous studies, zonal differences in quantitative MRI parameters were described, with the lowest values presented in the middle zone of the meniscus [16, 33, 37, 39]. Even in healthy subjects, there was a certain degree of heterogeneity in T2 relaxation times [15]. In addition, due to differences

in mechanical pressure and collagen content, degenerative changes vary between meniscal zones [37]. This is probably the main reason why differentiation between healthy patients and patients with only light signs of meniscal degeneration proves difficult.

Nebelung and colleagues [16] compared multiple quantitative MRI parameters, such as T1, T1p, T2, T2\* and UTE T2\*, with histology as a reference standard in an ex vivo study design [16]. They found a significant increase in all imaging parameters except for T2\*. They also reported a significant positive and strong correlation of MRI parameters with histological scores. Eijgenraam and colleagues [30] also emphasized the power of T2 relaxation time as a non-invasive biomarker in the case of osteoarthritis. They found a stronger correlation between T2 and histologic scoring compared to the data of the present study, which may be attributed to their smaller sample size and higher osteoarthritis grade in patients. It is possible that MR imaging techniques that achieve extremely short echo times, such as UTE and T2, are more suitable for quantifying menisci matrix composition than standard spin-echo techniques that rely on T2 mapping [33, 40, 41]. In the aforementioned study by Nebelung et al. [16], the results of UTE T2\* mapping were comparable to those of T2 mapping.

The present results show that T2 mapping should be used with caution as a biomarker for early meniscal degeneration. The results of this study suggest that there is a certain degree of histological change in menisci, even if there are no altered T2 relaxation times. Critical consideration must be given to whether the degenerative meniscal changes are of clinical relevance. The degeneration of menisci found in this study may reflect normal age-related changes because we examined menisci of elderly dogs.

T2 mapping allows for a relatively wide range of TEs. It allows both short and longer TEs. Short TEs are useful for the assessment of menisci and longer TEs may be useful to assess other joint structures, for example the articular cartilage [9, 26, 31, 32]. T2 mapping can thus be a good tool to detect early matrix changes in joint structures. Early detection of such changes can improve the understanding of osteoarthritis development. It also helps to initiate therapy as early as possible to slow the progression of the disease. The objective is to identify patients at risk of osteoarthritis before the onset of clinical symptoms.

The limitations of the present study included the inhomogeneous study population, which was due to the fact that only cadavers from an animal hospital were accessible as study samples. The dogs varied in breed, sex, weight and age. Additionally, most of the dogs showed only slight signs of osteoarthritis. Therefore, the radiological and histological differences between the individual joints were rather slight. The results would have been statistically stronger if a group of healthy animals and a group of animals with severe degrees of osteoarthritis. The menisci showed a relatively small range in the histologic score. This was possibly due to the limited number of histologic slides for each meniscus. Furthermore, the histological scoring did not differentiate between the meniscal zones. For more information on

zonal details and differences, a separate examination of the anterior horn, middle zone and posterior horn would be beneficial.

Future studies should include a larger and more homogeneous study population. In addition, meniscal zones should be subdivided according to anatomic features for both T2 mapping and histologic examination.

## 5. Conclusions

In summary, our results suggest that there are histological degenerations in menisci of older dogs, even if there are no significant radiological signs of osteoarthritis, including no significant changes in T2 relaxation time.

**6. Author Contributions:** Conceptualization, L.B., A.M., S.B. and M.B.; methodology, L.B., A.M. and M.B.; software, A.M.; validation, L.B., A.M. and M.B.; formal analysis, L.B., A.M., M.B. and J.D.; investigation, L.B.; resources, L.B., A.M., S.B., M.B. and S.N.; data curation, A.M., J.D. and L.B.; writing—original draft preparation, L.B.; writing—review and editing, A.M., M.B., S.N. and S.B.; visualization, L.B. and A.M.; supervision, S.N. and S.B.; project administration, S.N., S.B. and M.B.; funding acquisition, S.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**7. Funding:** This research received no external funding.

**8. Institutional Review Board Statement:** This study did not require ethical approval because there were no living animals involved.

**9. Informed Consent Statement:** Not applicable

**10. Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly accessible due to data protection.

**11 Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## 12. References

1. Pownder SL, Hayashi K, Caserto BG, et al. Magnetic Resonance Imaging T2 Values of Stifle Articular Cartilage in Normal Beagles. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2018; 31 (2): 108–113. doi:10.3415/VCOT-17-03-0093
2. Ding C, Cicuttini F, Jones G. How important is MRI for detecting early osteoarthritis? *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008; 4 (1): 4–5. doi:10.1038/ncprheum0676

3. MacFarlane LA, Yang H, Collins JE, et al. Associations among meniscal damage, meniscal symptoms and knee pain severity. *Osteoarthritis Cartilage* 2017; 25 (6): 850–857. doi:10.1016/j.joca.2016.12.023
4. Antony B, Driban JB, Price LL, et al. The relationship between meniscal pathology and osteoarthritis depends on the type of meniscal damage visible on magnetic resonance images: data from the Osteoarthritis Initiative. *Osteoarthritis Cartilage* 2017; 25 (1): 76–84. doi:10.1016/j.joca.2016.08.004.
5. Hu J, Xin H, Chen Z, et al. The role of menisci in knee contact mechanics and secondary kinematics during human walking. *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 2019; 61: 58–63. doi:10.1016/j.clinbiomech.2018.11.009
6. Fox AJS, Wanivenhaus F, Burge AJ, et al. The human meniscus: a review of anatomy, function, injury, and advances in treatment. *Clin Anat* 2015; 28 (2): 269–287. doi:10.1002/ca.22456
7. McDermott I. Meniscal tears, repairs and replacement: their relevance to osteoarthritis of the knee. *Br J Sports Med* 2011; 45 (4): 292–297. doi:10.1136/bjsm.2010.081257
8. Mosher TJ, Dardzinski BJ. Cartilage MRI T2 relaxation time mapping: overview and applications. *Semin Musculoskelet Radiol* 2004; 8 (4): 355–368. doi:10.1055/s-2004-861764
9. Oei EHG, van Tiel J, Robinson WH, et al. Quantitative radiologic imaging techniques for articular cartilage composition: toward early diagnosis and development of disease-modifying therapeutics for osteoarthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2014; 66 (8): 1129–1141. doi:10.1002/acr.22316
10. Arno S, Bell CP, Xia D, et al. Relationship between meniscal integrity and risk factors for cartilage degeneration. *Knee* 2016; 23 (4): 686–691. doi:10.1016/j.knee.2015.11.004
11. Hofmann FC, Neumann J, Heilmeyer U, et al. Conservatively treated knee injury is associated with knee cartilage matrix degeneration measured with MRI-based T2 relaxation times: data from the osteoarthritis initiative. *Skeletal Radiol* 2018; 47 (1): 93–106. doi:10.1007/s00256-017-2759-6
12. Banjar M, Horiuchi S, Gedeon DN, et al. Review of Quantitative Knee Articular Cartilage MR Imaging. *Magn Reson Med Sci* 2022; 21 (1): 29–40. doi:10.2463/mrms.rev.2021-0052
13. Baum T, Joseph GB, Karampinos DC, et al. Cartilage and meniscal T2 relaxation time as non-invasive biomarker for knee osteoarthritis and cartilage repair procedures. *Osteoarthritis Cartilage* 2013; 21 (10): 1474–1484. doi:10.1016/j.joca.2013.07.012
14. Wang A, Pedoia V, Su F, et al. MR T1 $\rho$  and T2 of meniscus after acute anterior cruciate ligament injuries. *Osteoarthritis Cartilage* 2016; 24 (4): 631–639. doi:10.1016/j.joca.2015.11.012
15. Rauscher I, Stahl R, Cheng J, et al. Meniscal measurements of T1 $\rho$  and T2 at MR imaging in healthy subjects and patients with osteoarthritis. *Radiology* 2008; 249 (2): 591–600. doi:10.1148/radiol.2492071870

16. Nebelung S, Tingart M, Pufe T, et al. Ex vivo quantitative multiparametric MRI mapping of human meniscus degeneration. *Skeletal Radiol* 2016; 45 (12): 1649–1660. doi:10.1007/s00256-016-2480-x
17. Diekmann HU. Analysis of the pathogenesis and progression of osteoarthritis in canine stifle joints considering three bone healing markers (13.09.2022). Im Internet: [https://elib.tiho-hannover.de/receive/etd\\_mods\\_00000009](https://elib.tiho-hannover.de/receive/etd_mods_00000009); Stand: 09.01.2023
18. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteo-arthrosis. *Ann Rheum Dis* 1957; 16 (4): 494–502. doi:10.1136/ard.16.4.494
19. Puchtler H, Waldrop FS, Valentine LS. Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red FBA. *Beitr Pathol* 1973; 150 (2): 174–187. doi:10.1016/S0005-8165(73)80016-2
20. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 1979; 11 (4): 447–455. doi:10.1007/bf01002772
21. Whittaker P. Polarized light microscopy in biomedical research. *Microscopy and Analysis* 1995 (44): 15–17
22. Romeis, B. *Mikroskopische Technik*. 17. Aufl; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, Germany, 1989.
23. Sun Y, Mauerhan DR, Kneisl JS, et al. Histological examination of collagen and proteoglycan changes in osteoarthritic menisci. *Open Rheumatol J* 2012; 6: 24–32. doi:10.2174/1874312901206010024
24. Pauli C, Grogan SP, Patil S, et al. Macroscopic and histopathologic analysis of human knee menisci in aging and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2011; 19 (9): 1132–1141. doi:10.1016/j.joca.2011.05.008
25. Harper TAM, Jones JC, Saunders GK, et al. Sensitivity of low-field T2 images for detecting the presence and severity of histopathologic meniscal lesions in dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 2011; 52 (4): 428–435. doi:10.1111/j.1740-8261.2011.01818.x
26. Pownder SL, Hayashi K, Caserto BG, et al. Quantitative Magnetic Resonance Imaging and Histological Comparison of Normal Canine Menisci. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2018; 31 (6): 452–457. doi:10.1055/s-0038-1668115
27. Jackson J, Vasseur PB, Griffey S, et al. Pathologic changes in grossly normal menisci in dogs with rupture of the cranial cruciate ligament. *J Am Vet Med Assoc* 2001; 218 (8): 1281–1284. doi:10.2460/javma.2001.218.1281
28. Roughley PJ, Lee ER. Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. *Microsc Res Tech* 1994; 28 (5): 385–397. doi:10.1002/jemt.1070280505

29. Dijkgraaf LC, Bont LG de, Boering G, et al. Normal cartilage structure, biochemistry, and metabolism: a review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg* 1995; 53 (8): 924–929. doi:10.1016/0278-2391(95)90283-x
30. Eijgenraam SM, Bovendeert FAT, Verschueren J, et al. T2 mapping of the meniscus is a biomarker for early osteoarthritis. *Eur Radiol* 2019; 29 (10): 5664–5672. doi:10.1007/s00330-019-06091-1
31. Li X, Benjamin Ma C, Link TM, et al. In vivo T(1rho) and T(2) mapping of articular cartilage in osteoarthritis of the knee using 3 T MRI. *Osteoarthritis Cartilage* 2007; 15 (7): 789–797. doi:10.1016/j.joca.2007.01.011
32. Li H, Chen S, Tao H, et al. Quantitative MRI T2 relaxation time evaluation of knee cartilage: comparison of meniscus-intact and -injured knees after anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med* 2015; 43 (4): 865–872. doi:10.1177/0363546514564151
33. Williams A, Qian Y, Golla S, et al. UTE-T2\* mapping detects sub-clinical meniscus injury after anterior cruciate ligament tear. *Osteoarthritis Cartilage* 2012; 20 (6): 486–494. doi:10.1016/j.joca.2012.01.009
34. Zarins ZA, Bolbos RI, Pialat JB, et al. Cartilage and meniscus assessment using T1rho and T2 measurements in healthy subjects and patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2010; 18 (11): 1408–1416. doi:10.1016/j.joca.2010.07.012
35. Mittal S, Pradhan G, Singh S, et al. T1 and T2 mapping of articular cartilage and menisci in early osteoarthritis of the knee using 3-Tesla magnetic resonance imaging. *Pol J Radiol* 2019; 84: e549–e564. doi:10.5114/pjr.2019.91375
36. van Tiel J, Kotek G, Reijman M, et al. Is T1p Mapping an Alternative to Delayed Gadolinium-enhanced MR Imaging of Cartilage in the Assessment of Sulphated Glycosaminoglycan Content in Human Osteoarthritic Knees? An in Vivo Validation Study. *Radiology* 2016; 279 (2): 523–531. doi:10.1148/radiol.2015150693
37. Son M, Goodman SB, Chen W, et al. Regional variation in T1p and T2 times in osteoarthritic human menisci: correlation with mechanical properties and matrix composition. *Osteoarthritis Cartilage* 2013; 21 (6): 796–805. doi:10.1016/j.joca.2013.03.002
38. Ghadially FN, Lalonde JM, Wedge JH. Ultrastructure of normal and torn menisci of the human knee joint. *J Anat* 1983; 136 (Pt 4): 773–791
39. Tsai P-H, Chou M-C, Lee H-S, et al. MR T2 values of the knee menisci in the healthy young population: zonal and sex differences. *Osteoarthritis Cartilage* 2009; 17 (8): 988–994. doi:10.1016/j.joca.2009.03.009
40. McWalter EJ, Gold GE. UTE T2\* mapping detects sub-clinical meniscus degeneration. *Osteoarthritis Cartilage* 2012; 20 (6): 471–472. doi:10.1016/j.joca.2012.02.640

41. Sneag DB, Shah P, Koff MF, et al. Quantitative Ultrashort Echo Time Magnetic Resonance Imaging Evaluation of Postoperative Menisci: a Pilot Study. *HSS J* 2015; 11 (2): 123–129. doi:10.1007/s11420-014-9420-x

### 3. Publikation II

## Magnetisation transfer, T1 and T2\* relaxation in canine menisci of elderly dogs - an *ex vivo* study in stifle joints

Lena Bunzendahl<sup>1,2</sup>, Amir Moussavi<sup>2,4</sup>, Martina Bleyer<sup>3</sup>, Stephan Neumann<sup>1</sup>, Susann Boretius<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Small Animal Clinic, Institute of Veterinary Medicine, Georg-August University of Göttingen, 37077 Göttingen, Germany; lena.bunzendahl@uni-goettingen.de

<sup>2</sup>Functional Imaging Laboratory, German Primate Center, Leibniz Institute for Primate Research, 37077 Göttingen, Germany; amoussavi@dpz.eu

<sup>3</sup>Pathology Unit, German Primate Center, Leibniz Institute for Primate Research, 37077 Göttingen, Germany; mbleyer@dpz.eu

<sup>4</sup>Fachhochschule Südwestfalen, University of Applied Sciences, 58095 Hagen; moussavi.amir@fh-swf.de

Frontiers in Veterinary Science

Sec.: Veterinary Imaging

(Journal impact factor: 2,6)

Volume 12, Date 2025, Article

DOI: 10.3389/fvets.2025.1521684

Accepted on February 10<sup>th</sup> 2025

**Keywords:** multi-parameter MRI, T2\* mapping, T1 mapping, magnetisation transfer, canine menisci, osteoarthritis, stifle joint, proteoglycans

### Abstract

Magnetic resonance imaging (MRI) is widely used in human medicine, offering multiple contrast mechanisms to visualise different tissue types. It is also gaining importance in veterinary medicine, including diagnosing joint disorders. The menisci of the stifle joint play a crucial role in the development of osteoarthritis (OA), and multi-parameter MRI of the menisci may aid in early OA diagnosis, potentially improving therapeutic outcomes.

In a previous *ex vivo* study, we measured T2 relaxation times in menisci of elderly dogs with mild histological signs of degeneration but no clinical symptoms of lameness. As no significant changes in T2 relaxation times were observed in relation to histological scores, the present study extends this investigation by exploring more advanced MR parameters—including T1 relaxation time, T2\*

relaxation time, magnetisation transfer ratio (MTR), and magnetisation transfer saturation (MTsat)—to assess their potential for detecting early microstructural changes in the menisci.

While T2\* relaxation times and MTR showed no significant variation across histological scores, MTsat values increased with higher proteoglycan staining. In contrast, the apparent T1 relaxation time (T1app) was lower in menisci with elevated proteoglycan scores and increased with higher cellularity scores.

The correlation between MTsat and proteoglycan content suggests that MTsat, along with T1app, could be a promising parameter for characterising the extracellular matrix. However, further research is needed to validate these findings.

## **1. Introduction**

Osteoarthritis (OA) of the canine stifle joint is a predominantly degenerative joint disease, especially common in older dogs. OA frequently develops in the context of cranial cruciate ligament disease (POWNDER et al., 2018) and is closely associated with damage or degeneration of the menisci. These fibrocartilaginous structures play a critical role in absorbing compressive loads and maintaining joint stability, which helps to protect the articular cartilage from excessive wear (MCDERMOTT, 2011; FOX et al., 2015; HU et al., 2019). As OA progresses, it leads to structural changes in all joint components, including the medial and lateral menisci, making meniscal degeneration a key factor in OA onset and progression.

Magnetic resonance imaging (MRI) is the gold standard for diagnosing knee disorders in humans, offering high-resolution, non-invasive imaging of soft tissues and bone structures. It is routinely employed to detect meniscal tears, ligament injuries, and cartilage degeneration (ZARINS et al., 2010; WELSCH et al., 2011; HOFMANN et al., 2018; MITTAL et al., 2019; EIJGENRAAM et al., 2019; ZHANG et al., 2021; BANJAR et al., 2022; LEE et al., 2023). In veterinary medicine, although traditionally less common, the use of MRI is steadily increasing (GAVIN, 2011; LABRUYÈRE u. SCHWARZ, 2013). In addition to identifying macroscopic injuries (ARNO et al., 2016; HOFMANN et al., 2018; BANJAR et al., 2022) MRI is gaining importance in characterising tissue microstructures. Recent advances in quantitative and semi-quantitative techniques have proven particularly useful for assessing microscopic changes in humans (LI et al., 2005; MOSHER et al., 2010; MAMISCH et al., 2012; EIJGENRAAM et al., 2019) and animals (HARPER et al., 2011; POWNDER et al., 2018; POWNDER et al., 2018; HONTOIR et al., 2019).

The menisci are composed of fibrochondrocytes embedded in an extracellular matrix primarily consisting of water, collagen, and proteoglycans (MCDEVITT u. WEBBER, 1990; AUFDERHEIDE u. ATHANASIOU, 2004; ABRAHAM et al., 2011; AIDOS et al., 2022). The collagen fibres, primarily type I

with smaller amounts of type II and III, are arranged in radial and circumferential patterns, allowing the menisci to resist multidirectional stresses. Proteoglycans, mainly aggrecan, make up 1-2% of the meniscal dry weight and contain glycosaminoglycan (GAG) chains such as chondroitin sulphate and keratan sulphate (MCDEVITT u. WEBBER, 1990).

In osteoarthritic menisci, alterations in the extracellular matrix commonly lead to increased water content and mobility, which in turn influences the T2 relaxation time. Elevated T2 relaxation times have been documented in human meniscus degeneration (HOFMANN et al., 2018; EIJGENRAAM et al., 2019). In a previous *ex vivo* study, we measured T2 relaxation times in menisci from elderly dogs with mild histological degeneration but without clinical signs of lameness. The results showed no significant changes in T2 relaxation times with higher histological scores, suggesting that these early degenerative changes did not markedly affect the T2 values (BUNZENDAHL et al., 2023). We have now expanded our investigation to include T1 and T2\* relaxation times, as well as magnetisation transfer (MT) techniques and the derived parameters, including magnetisation transfer ratio (MTR) and magnetisation transfer saturation (MTsat).

These advanced MR parameters are not yet part of routine clinical diagnostics in human or veterinary medicine, partly due to longer acquisition times and the complexity of data interpretation (TOFTS, 2003b; BERG et al., 2022). However, these techniques are gaining significance in medical imaging (BERG et al., 2022), and *post mortem* studies may help to identify promising candidates for future clinical applications. In the following, we will briefly address the potential advantages and added value of these techniques for the microtissue characterization of the menisci.

Given the observed increase in water content during meniscal degeneration, T2\* relaxation times may behave similarly to T2 relaxation times. Nebelung et al. reported higher T2\* relaxation values correlating with increasing histological scores in humans, though primarily at the extreme ends of the spectrum (NEBELUNG et al., 2016). Furthermore, Lee et al. found a positive correlation between contact strain and T2\* relaxation times in the articular cartilage of cattle (LEE et al., 2023). Although T2 and T2\* are related, T2\* is more sensitive to magnetic field inhomogeneities, potentially providing additional insights into subtle tissue changes such as variation in fiber density and orientation. However, this heightened sensitivity poses challenges for data acquisition and interpretation, limiting its current clinical use.

T1 relaxation time, another parameter sensitive to water content, is valuable for assessing cartilage and soft tissues (REGATTE et al., 2004; LI et al., 2005; BRANDT et al., 2006; MITTAL et al., 2019), but its application to the meniscus remains largely in the research phase.

MT techniques have been widely applied to indirectly assess macromolecular content in various biological tissues (GRAY et al., 1995; MEHTA et al., 1995; ROPELE u. FAZEKAS, 2009; LI et al., 2010;

OLSSON et al., 2021). These methods exploit the interaction between free water protons and protons bound to macromolecules. By selectively saturating the bound protons, magnetisation is transferred to the free water protons, resulting in a reduction in signal intensity. The MTR quantifies the degree of this signal loss by comparing it to a data set acquired without the saturating radiofrequency pulse. Higher MTR values typically indicate denser macromolecular structures (ZHANG et al., 2021). Several studies have measured MTR in articular cartilage and menisci, reporting lower MTR values in tissues with reduced collagen and proteoglycan content (REGATTE et al., 2004; LI et al., 2010; ZHANG et al., 2021).

A limitation of MTR is its lack of specificity. Various factors, such as inflammation and oedema, can influence the results. Additionally, MTR is susceptible to B<sub>0</sub> (main magnetic field) and B<sub>1</sub> (radiofrequency) field inhomogeneities and highly sensitive to acquisition parameters, such as the choice of saturation pulse, which can lead to inconsistent values and makes standardisation across different studies or clinical environments challenging. To address these limitations, quantitative magnetisation transfer (qMT) methods have been developed. These techniques provide more specific and reproducible macromolecular parameters, such as the macromolecular pool size fraction and the exchange rate between free and bound protons. However, the advantages of qMT come at the cost of longer acquisition times and more complex data processing, limiting its availability in clinical practice.

Helms et al. (HELMS et al., 2008) introduced a technique called MTsat that bridges the gap between the simplicity of MTR and the complexity of full qMT imaging. MTsat incorporates corrections for B<sub>1</sub> inhomogeneities and T<sub>1</sub> relaxation times, providing more accurate data but with shorter acquisition times compared to full qMT. MTsat is increasingly used in research settings, particularly for studying neurological disorders (WEISKOPF et al., 2013b; GRABHER et al., 2015; LEMA et al., 2017; LEUTRITZ et al., 2020a). To our knowledge, this technique has not yet been applied to examine musculoskeletal structures. We hypothesize that MRsat may be suitable for quantifying the macromolecular content of the meniscus, thereby offering more detailed insights into the remodeling processes of menisci during degeneration.

In this study, we determined the T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub>\* relaxation times, along with MTR and MTsat, in menisci from elderly dogs as previously described. Our goal was to evaluate the sensitivity of these MR parameters in detecting relatively mild degenerative tissue changes in mostly normally aged menisci and to determine whether and how these parameters can identify specific types of tissue alterations. If successful, these early markers could enhance the understanding of osteoarthritis pathogenesis and pave the way for more effective treatment strategies.

## **2. Materials and methods**

## 2.1. Study samples

The stifle joints used in this study have been described previously (BUNZENDAHL et al., 2023). One joint had to be excluded from the original cohort of 16 joints from 8 dogs due to image artefacts. In total, 30 menisci from 15 joints (15 medial, 15 lateral) were included. Only elderly dogs, aged between 10 and 17 years, were selected for the study. None of the dogs had a history of hindlimb lameness or stifle instability. The reasons for the required euthanasia were unrelated to this study. Additional patient information can be found in Bunzendahl et al. (BUNZENDAHL et al., 2023).

Based on the results of X-ray scoring using the modified Kellgren-Lawrence scale (DIEKMANN; KELLGREN u. LAWRENCE, 1957), 29% of the joints showed no radiographic evidence of osteoarthritis (score 0). The remaining 71% exhibited mild signs of osteoarthritis, corresponding to a score of 1.

Histological scoring was based on a system adapted from Sun et al. 2012 (SUN et al., 2012) and Pauli et al. 2011 (PAULI et al., 2011), which includes individual scores for meniscus cellularity (0 to 3), collagen content (0 to 2), collagen organisation (0 to 3), and proteoglycan content (0 to 2). Additionally, a total score was calculated by summing up all the individual scores, resulting in a maximum possible total score of 10. Among the 30 menisci, one was classified with a total score of 0, while the highest total score observed was 6 ( $n = 2$ ).

## 2.2. MR imaging

Before MRI, the stifle joints were dissected from the surrounding tissue and fixed in 10% neutral-buffered formaldehyde. The joints, submerged in the formaldehyde solution were positioned in a flexible 16-channel receive-coil (Variety, NORAS MRI products GmbH, Hochberg, Germany). All MR measurements were performed using a 3 Tesla whole-body MR system (MAGNETOM Prisma, Siemens Healthineers, Erlangen, Germany).

*Maps of  $T2^*$ -relaxation time* were estimated from 3D multi-echo gradient echo (GRE) images acquired with the following parameters: TR = 75 ms, TE = 5 - 64.5 ms in 8.5 ms increments (8 echos), flip angle  $\alpha = 25^\circ$ , and an isotropic resolution of 300  $\mu\text{m}$ . The total acquisition time was 1 hour and 14 minutes. The  $T2^*$ -maps were calculated using an in-house pixel-wise mono-exponential fitting routine (MATLAB R2021a, Math Works, Natick, MA, USA).

To estimate *MTR and  $MT_{\text{sat}}$* , 3D single-echo GRE images (TR = 27 ms, TE = 4 ms and 300  $\mu\text{m}$  isotropic resolution) with varying weightings were acquired. Weightings were achieved by applying an off-resonance saturation pulse (MT-weighted: MT flip angle =  $500^\circ$  and MT offset = 1500 Hz) or by modifying the flip angle  $\alpha$  (proton density (PD)-weighted:  $\alpha = 7^\circ$ ; T1-weighted:  $\alpha = 20^\circ$ ). The total

acquisition time was 27 minutes per acquisition. MTsat and T1 relaxation time were calculated as described in (HELMS et al., 2008). Since the measured T1 relaxation time reflects both intrinsic tissue properties and the effects of the imaging technique, it is referred to as the *apparent T1 relaxation time (T1app)*. T1app, T2\*-relaxation time, MTR and MTsat were extracted from manually defined regions of interest (ROIs) that segmented the medial and lateral menisci. All segmentations were consistently performed by the same experienced observer on T2-weighted images using the software program ITK-SNAP ([www.itksnap.org](http://www.itksnap.org)). The segmentation process utilized sagittal, transverse, and coronal planes as previously described (BUNZENDAHL et al., 2023). An example of the segmentation is shown in **Supplementary Figure 1**.

### 2.3. Statistical analysis

Statistical analyses were conducted using the Python libraries statsmodels (version 0.14.1, [www.statsmodels.org](http://www.statsmodels.org)), scipy (version 1.10.1, [www.scipy.org](http://www.scipy.org)), and scikit-learn (version 1.3.0, <http://scikit-learn.org>). To assess differences in MR parameters across the three values (0, 1, 2) of each histological score, a one-way ANOVA was performed using statsmodels.stats.anova. Given the limited sample size and deviations from normality assumptions for some parameters (scipy.stats.shapiro), the ANOVA results should be interpreted with caution and are presented here primarily for orientation purposes. To ensure transparency, individual data points are displayed in the corresponding figure, enabling readers to assess the data distribution and variability within and across groups.

Additionally, a linear regression analysis was conducted using sklearn.linear\_model, and the Pearson correlation coefficient was calculated with scipy.pearsonr. The normality of the residuals from the regression analysis was evaluated using scipy.stats.shapiro.

A paired t-test was applied to compare findings between the medial and lateral menisci using scipy.ttest\_rel. A p-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

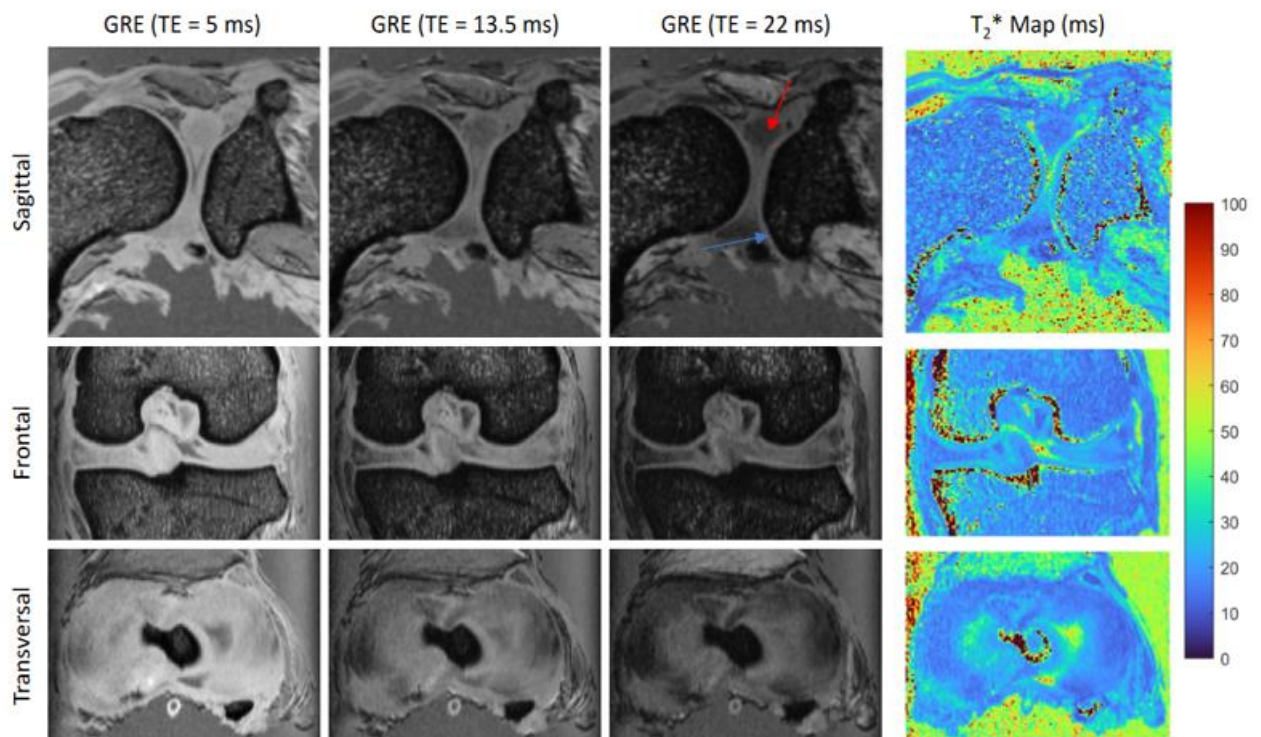
## 3. Results

### 3.1. Delineation of menisci on differently weighted images and their derived maps

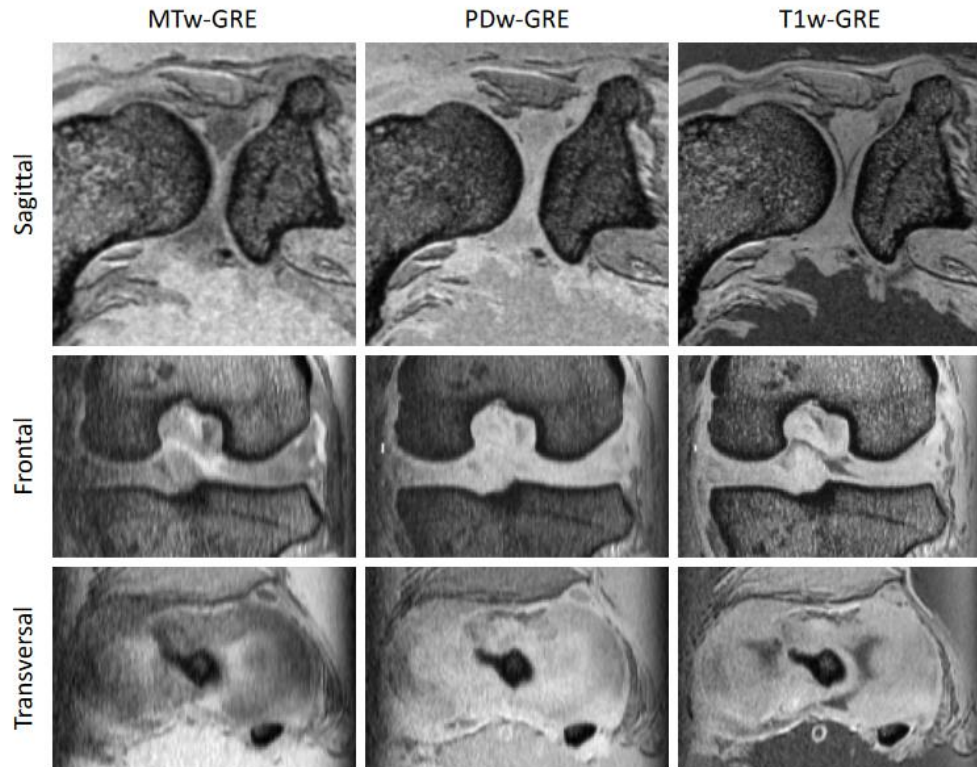
**Figures 1-3** illustrate the achieved image quality, all derived from the same joint. The T2\*-weighted images (**Figure 1**, GRE) clearly separate bone from softer tissues, including muscles and cartilage. As the echo time increases, the fibrous cartilage of the menisci (red arrow) becomes progressively better delineated from the hyaline articular cartilage (blue arrow), although the signal-to-noise ratio decreases. In the *post mortem* specimen, the best contrast was observed at TE = 22 ms. The improved delineation at longer TE is attributed to the shorter T2\* relaxation time of fibrous cartilage compared

to hyaline articular cartilage, as further confirmed by the calculated  $T_2^*$  relaxation time map (**Figure 1**, right).

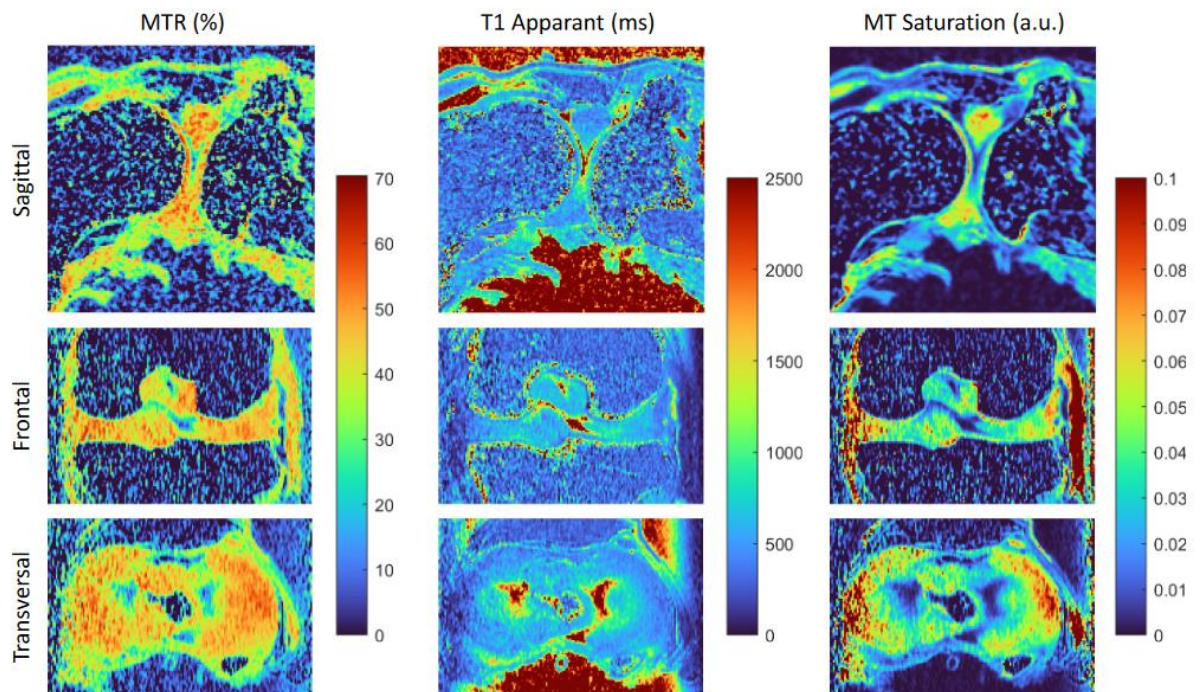
Interestingly, the macromolecule-based contrast of magnetisation transfer-weighted imaging also clearly delineates fibrous and hyaline cartilage, whereas proton density-weighted (PDw-GRE) and T1-weighted (T1w-GRE) images show very little difference (**Figure 2**). The higher MT in fibrous cartilage is particularly evident on the calculated maps of MTR and MTsat (**Figure 3**). Notably, the T1-corrected MTsat map provides even better results than MTR, offering enhanced contrast and more precise tissue delineation.



**Figure 1:** Orthogonal slices acquired with a 3D multi-gradient echo (GRE) sequence show the best contrast between the fibrous cartilage of the menisci (red arrow) and the hyaline articular cartilage (blue arrow) at an echo time (TE) of 22 ms. The corresponding  $T_2^*$  maps confirm the shorter  $T_2^*$  relaxation time of the menisci compared to the articular cartilage.



**Figure 2:** Comparison of images acquired with a 3D multi-gradient echo (GRE) proton-density weighted (PD) sequence with (MTw-GRE) and without (PDw-GRE) magnetisation transfer preparation, as well as the corresponding T1 weighted images (T1w-GRE). The macromolecule-based contrast of MTw-GRE provided the clearest delineation of fibrous and hyaline cartilage across all three orthogonal slices.

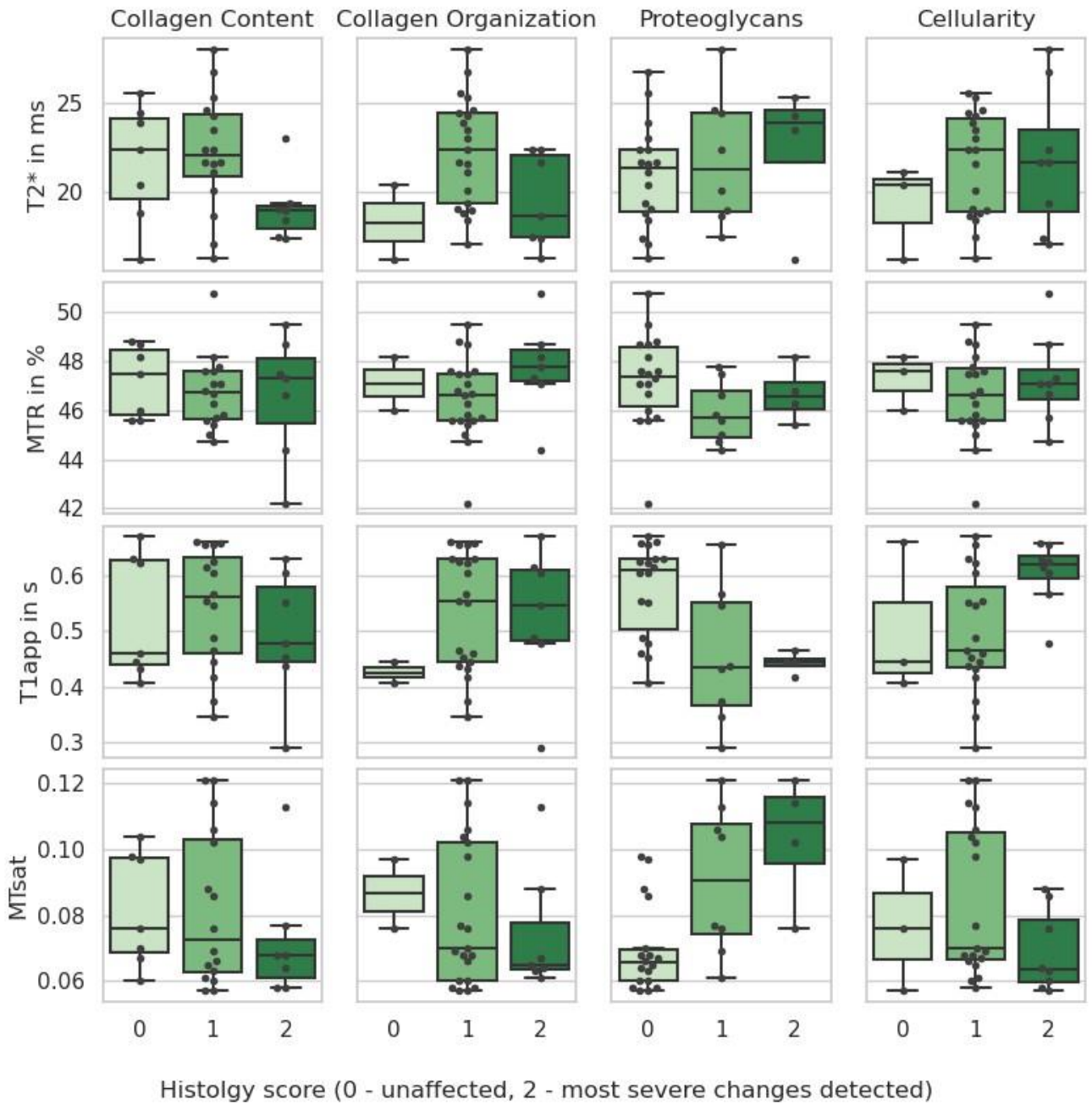


**Figure 3:** Maps of the magnetisation transfer ratio (MTR), apparent T1 relaxation time and magnetisation transfer saturation (MT saturation) calculated from the data sets shown in Figure 2. Both magnetisation transfer maps reveal differences between fibrous and hyaline cartilage, with the T1-corrected MTsat map offering enhanced contrast.

### *3.2. Relationship between histological scores and MR parameters*

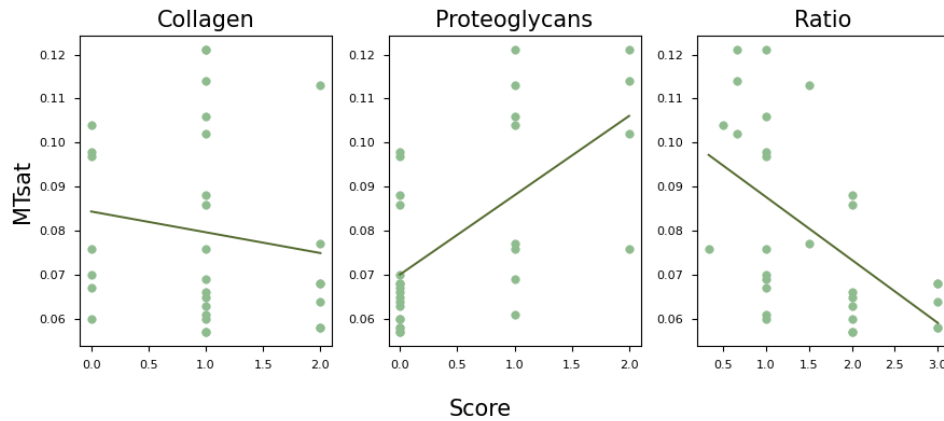
The menisci included in this study exhibited histological scores for cellularity, proteoglycan content, collagen content, and collagen organisation ranging from 0 to 2. To assess whether these mild histological alterations were reflected in the MR parameters, the measured values were initially categorised according to the corresponding histological scores for each staining (**Figure 4**). A one-way ANOVA was performed primarily as an exploratory tool to provide an initial overview of potential differences in the MR parameters across the three scores. Additionally, the Pearson correlation coefficient was calculated to assess the relationship between each histological score and the corresponding MR parameter.

While most MR parameters did not show significant differences across individual scores, T1app decreased with increasing proteoglycan staining (ANOVA:  $p < 0.003$ ; Pearson correlation:  $r = -0.54$ ,  $r < 0.003$ ) and increased with higher cellularity scores (ANOVA,  $p < 0.05$ ,  $r = 0.37$ ,  $p < 0.05$ ). In contrast, MTsat values were higher in menisci with elevated proteoglycan scores (ANOVA,  $p < 0.0003$ , Pearson correlation:  $r = 0.63$ ,  $p < 0.0003$ ).



**Figure 4:** Boxplot of MRI parameters across different histological scores. The apparent T1 relaxation time ( $T_{1app}$ ) is shorter in menisci with increased proteoglycan staining and longer in those with increased cellularity score. In contrast,  $MT_{sat}$  values (magnetisation transfer saturation) are higher in menisci with elevated proteoglycan scores.

Interestingly, collagen and proteoglycan content appeared to have opposite effects on  $MT_{sat}$ . To explore this further, we calculated the ratio of the collagen and proteoglycan scores, adjusting all values by adding one to avoid division by zero. The results are shown in **Figure 5**, where  $MT_{sat}$  significantly decreased with a higher collagen-to-proteoglycan ratio ( $r=-0.56$ ,  $p<0.002$ ).

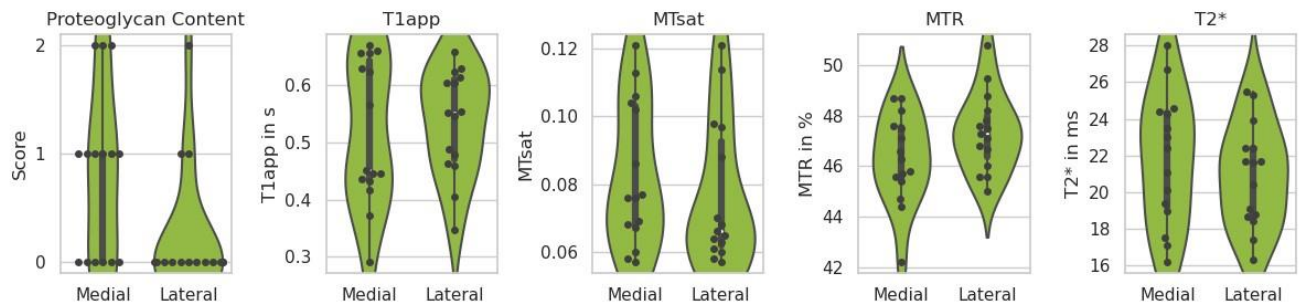


**Figure 5:** MTsat (magnetisation transfer saturation) values in relation to collagen and proteoglycan content. Collagen and proteoglycan scores appear to have opposite effects on MTsat. Specifically, MTsat tends to decrease with lower collagen content ( $r = -0.16$ ,  $p = 0.43$ ), while it increases with increased proteoglycan staining ( $r = 0.62$ ,  $p < 0.0003$ ). This relationship is further reflected in lower MTsat values associated with a reduced collagen-to-proteoglycan ratio (left,  $r = -0.56$ ,  $p < 0.002$ ).

To investigate a potential correlation between the severity of changes and the MRI parameters, we summarised, as previously described (BUNZENDAHL et al., 2023), all individual histological scores into a total score and performed a correlation analysis between the total score and the MRI parameters. When analysing the lateral and medial menisci together, none of the parameters showed a significant correlation with the total score. A separate analysis of the lateral and medial menisci indicated a potential mild negative correlation between MTR and the total score in the medial menisci, though this trend did not reach statistical significance ( $r = -0.48$ ,  $p = 0.08$ , **Supplementary Figure 2**).

### 3.3. Comparison of lateral and medial menisci

Due to their restricted mobility, medial menisci are more prone to injury and may be more susceptible to degenerative changes over time (FLO, 1993). The histological analysis of the menisci included in this study revealed no statistically significant difference between the medial and lateral menisci (**Supplementary Table 1**), except for the proteoglycan score. On average, the medial menisci exhibited more intense proteoglycan staining (higher score), with greater variability between samples (paired t-test,  $p = 0.006$ ) (**Figure 6, left**). To determine whether these histological differences are reflected in any of the MR parameters, the values for T2\*, T1, MTR, and MTsat were analysed separately for lateral and medial menisci. None of the investigated parameters showed a significant difference, although MTR displayed a trend toward lower levels in the medial menisci (paired t-test,  $p = 0.059$ ), as shown in **Figure 6**. The mean and standard deviation for each MR parameter, separated by lateral and medial menisci, are summarised in **Table 1**.



**Figure 6:** Comparison of lateral and medial menisci. The medial menisci exhibited more intense proteoglycan staining (higher score) and greater variability between the analysed samples. Among the quantitative MRI parameters, only the magnetisation transfer ratio (MTR) indicated a potential difference, showing a trend toward lower values in the medial menisci. T1app - apparent T1 relaxation time, MTsat – magnetisation transfer saturation.

**Table 1:** Mean values and standard deviations (SD) of the respective magnetic resonance (MR) parameters (MTR – magnetisation transfer ratio, T1app - apparent T1 relaxation time, MTsat – magnetisation transfer saturation) in the medial and lateral menisci. A paired t-test was applied to assess significant differences, and the corresponding p-values are provided.

MR parameter	medial (mean±SD)	menisci	lateral menisci (mean±SD)	p-value
<b>MTR</b>	46.3±1.7 ms		47.4±1.5ms	0.06
<b>T1app</b>	517±121 ms		536±88 ms	0.56
<b>MTsat</b>	0.08±0.02 ms		0.08±0.02 ms	0.24
<b>T2*</b>	21.8±3.4 ms		20.9 ±0.7 ms	0.27

#### 4. Discussion

In this *ex vivo* study, we evaluated the detectability of mild, histologically confirmed degeneration in the menisci of elderly dogs with no history of hindlimb lameness using MRI. None of the included dogs showed signs of meniscal tears or other macroscopically visible injuries. Therefore, the samples can be considered representative of canine menisci from essentially normally aged dogs. Building on our previous study, which primarily investigated T2 relaxation times (BUNZENDAHL et al., 2023), we broadened our analysis to include T2\* and T1 relaxation times, MTR, and MTsat. Our aim was to explore the suitability of these MR parameters for identifying mild changes in tissue microstructure associated with age-related degradation. Previous MRI studies on dog stifles have mainly concentrated on T2 and T2\* weighted images or the corresponding relaxation time maps (HARPER et al., 2011; POWNDER et al., 2018; POWNDER et al., 2018). To our knowledge, this is the first study on canine menisci that has additionally incorporated magnetisation transfer techniques.

Compared to hyaline cartilage, MRI of the menisci can be more challenging. Their lower water content, dense collagen network, and restricted proton mobility lead to rapid signal attenuation due to their short T2 and T2\* relaxation times (WILLIAMS et al., 2012; NEBELUNG et al., 2016). This also applies to *post mortem* imaging, as demonstrated in this study. Increasing the echo time of a gradient echo

sequence, thereby enhancing T2\* weighting, improved the delineation between hyaline cartilage and the menisci. However, excessively long echo times resulted in insufficient signal intensity. Furthermore, the MTR and MTsat values of the menisci were higher than those of hyaline cartilage, likely due to their dense collagen structure, offering a promising contrast mechanism for improved delineation.

The menisci analysed in this study exhibited relatively mild degenerative changes. The highest score observed in any histological staining did not exceed 2, and the highest total score was 6 (in 2 out of 30 menisci), with 10 being the maximum possible score. Our goal was to determine whether any of the tested MR parameters could reflect these subtle structural alterations. In summary, T2\* relaxation times and MTR showed no significant differences across histological scores, while T1app and MTsat correlated with certain scores. These findings will be discussed in more detail below.

T2\* relaxation time has been reported to increase following meniscal tears and other injuries. For instance, Koff et al. (KOFF et al., 2013) observed prolonged T2\* and T2 values in menisci after surgical repair in an ovine model. However, in the case of milder alterations, the results are less clear.

Nebelung et al. (NEBELUNG et al., 2016), for example, found no significant correlation between T2\* values and histological degeneration in human menisci using the Williams grading system, which considers properties such as cellularity, matrix organisation and matrix staining intensity - a finding that aligns with our observations. A relatively mild increase in extracellular water, as opposed to the pronounced changes seen in acute injuries, combined with almost preserved fiber density and orientation, may render T2\* less sensitive to detecting mild, age-related alterations. T2\* is also more susceptible to artifacts, for example due to magnetic field inhomogeneities. This could be one of the reasons for the high standard deviation for this parameter described in the literature [27]. In our study, there was a higher standard deviation for the medial menisci in particular. In addition to the low number of samples, this may be a reason for the difficulties in getting statistically significant results.

Interestingly, Pownder et al. [28] reported longer T2\* values in the caudal horn of the medial, histologically normal menisci of healthy beagles. We did not observe any significant differences between lateral and medial menisci, although we did not analyse the horns separately. A possible reason for these differing observations could be the MR sequences used. The ultrashort echo time (UTE) imaging employed by Pownder et al. is more prone to the magic angle effect. This effect occurs when collagen fibres are orientated at approximately 55 degrees to the main magnetic field (B0), resulting in an artificially increased signal due to the decreased dipolar interaction of protons in collagen-rich tissues. The longer echo times used in our study may have minimised this effect.

Degeneration of the menisci is often accompanied by changes in collagen content and collagen organisation, making MT techniques a promising candidate for early detection. Zhang et al. reported

significantly decreased MTR values in menisci from human patients with severe osteoarthritis. However, quantitative MT techniques appear to be more effective in detecting milder alterations (ZHANG et al., 2021). MTR can be affected by several confounding factors, including B1 inhomogeneity and T1 relaxation. It reflects both the exchange rate between free and bound protons and the recovery of longitudinal magnetisation of saturated spins. Consequently, when T1 relaxation times are shorter, the MT effect—and thus the apparent macromolecular content—may be underestimated, and *vice versa* (HENKELMAN et al., 2001).

The absence of significant changes in MTR in our study may be due to the relatively mild alterations in tissue properties. Additionally, the observed changes in T1 relaxation time could counterbalance the MT effect, potentially masking any detectable variations. Quantitative MT techniques aim to separate the effects of T1 relaxation from the MT effect, enabling parameters that more accurately reflect macromolecular content, such as the macromolecular fraction (MMF) or bound proton fraction (BPF).

Interestingly, Li et al. reported an increase in BPF associated with higher GAG levels in engineered cartilage (LI et al., 2010), which aligns with our findings. The toluidine blue, which we used in this study to assess the amount of proteoglycans semi-quantitatively, binds to the acidic GAGs within the proteoglycans. We found that menisci with increased proteoglycan staining showed higher MTsat values, a marker for magnetisation transfer that is corrected for T1 relaxation (HELMS et al., 2008).

The role of GAGs in the pathobiology of meniscal tissue remains debated, especially in dogs, with limited data available. Inflammatory processes may increase enzymes like matrix metalloproteinases (MMPs) and aggrecanase, leading to a reduction in proteoglycan content. Conversely, there may be an initial rise in proteoglycan synthesis as the tissue attempts to repair, accompanied by the inhibition of degrading enzymes to support recovery (LÓPEZ-FRANCO u. GÓMEZ-BARRENA, 2018; KRUPKOVA et al., 2018).

Notably, T1 relaxation time decreased with more intense proteoglycan staining and increased with higher cellularity scores, suggesting its potential for distinguishing between degenerative (reduced proteoglycan content, fibroblast-like cells) and regenerative processes (increased cellular activity and proteoglycan production) in the meniscus. In particular, the different phases or degrees of the degeneration process must be considered in a differentiated manner. In the course of degeneration, there are not only varying changes in the proteoglycan content. Cellularity is also initially increased before cell death occurs, which leads to acellular areas in the tissue. As no such severe degeneration was found in the examined menisci, no conclusive statement can be made here regarding the mr values. Another promising diagnostic parameter may be the collagen-to-proteoglycan ratio, as a decrease in this ratio was linked to lower MTsat values. However, further studies involving menisci with a broader range of pathological lesions are needed to validate these findings. Future research

should also compare MTsat and T1app directly with T1 $\rho$  in relation to the collagen-to-proteoglycan ratio, given T1 $\rho$ 's sensitivity to proteoglycan loss.

Besides the limitation of including only menisci with relatively mild changes and not having either healthy or severely affected menisci involved, the applied histological scoring system may also limit the correlation between MRI and histological findings. More quantitative, continuous readouts would be preferable. Further studies aim to address these limitations by include a broader range of pathological changes, larger sample size, additional histological methods and separate analyses of the meniscal body and horns.

Another limitation of this study is that all measurements were conducted *post mortem* on formalin-fixed tissue. Formalin affects the tissue's hydration state and thereby influences relaxation times (SON et al., 2013; NEBELUNG et al., 2016; BUNZENDAHL et al., 2023). Additionally, measurements were performed at room temperature, which is lower than body temperature and impacts several MRI-relevant properties, such as exchange rate, diffusivity, and T1 relaxation time (NOESKE, 2000). On the other hand, *post mortem* MRI studies offer the advantage of longer measurement times, allowing for higher spatial resolution and the simultaneous use of multiple contrast mechanisms. So, this approach can be used to test a wide range of MR contrasts, with the most promising ones then applied and validated *in vivo*.

MTsat and T1app are particularly promising parameters for future *in vivo* studies, which should aim to include a broad spectrum of meniscal alterations, extending beyond age-related changes in canine menisci.

The description of the morphological and biochemical composition of the menisci using the MR values mentioned here can be very valuable for the early detection of degenerative changes. A precautionary examination or early detection before morphological changes occur, can improve the patient's prognosis. In addition, the exact pathogenesis of morphological meniscal changes can be further clarified. This could also improve the understanding of the pathogenesis of osteoarthritis. Especially if other articular structures are also examined in this way.

## 5. Conclusions

In summary, none of the investigated contrast mechanisms showed high sensitivity or specificity for detecting mild changes in the tissue microstructure of canine menisci, as assessed by histological analyses using the modified scoring systems of Pauli (PAULI et al., 2011) and Sun (SUN et al., 2012). However, the observed correlation between MTsat and proteoglycan content may be a promising candidate for characterising the extracellular matrix, though further studies are needed to validate this effect.

## 6. Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## 7. Author contributions

Conceptualisation: L.B., A.M., S.B. and M.B.; methodology: L.B., A.M. and M.B.; software: A.M.; validation: L.B., A.M. and M.B.; formal analysis: L.B., A.M., M.B., SB; investigation: L.B.; resources: L.B., A.M., S.B., M.B. and S.N.; data curation: A.M., SB, and L.B.; writing—original draft preparation: L.B.; writing—review and editing: A.M., M.B., S.N. and S.B.; visualisation, L.B. and A.M.; super-vision: S.N. and S.B.; project administration: S.N., S.B. and M.B.; funding acquisition: S.N., S.B.. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

## 8. Funding

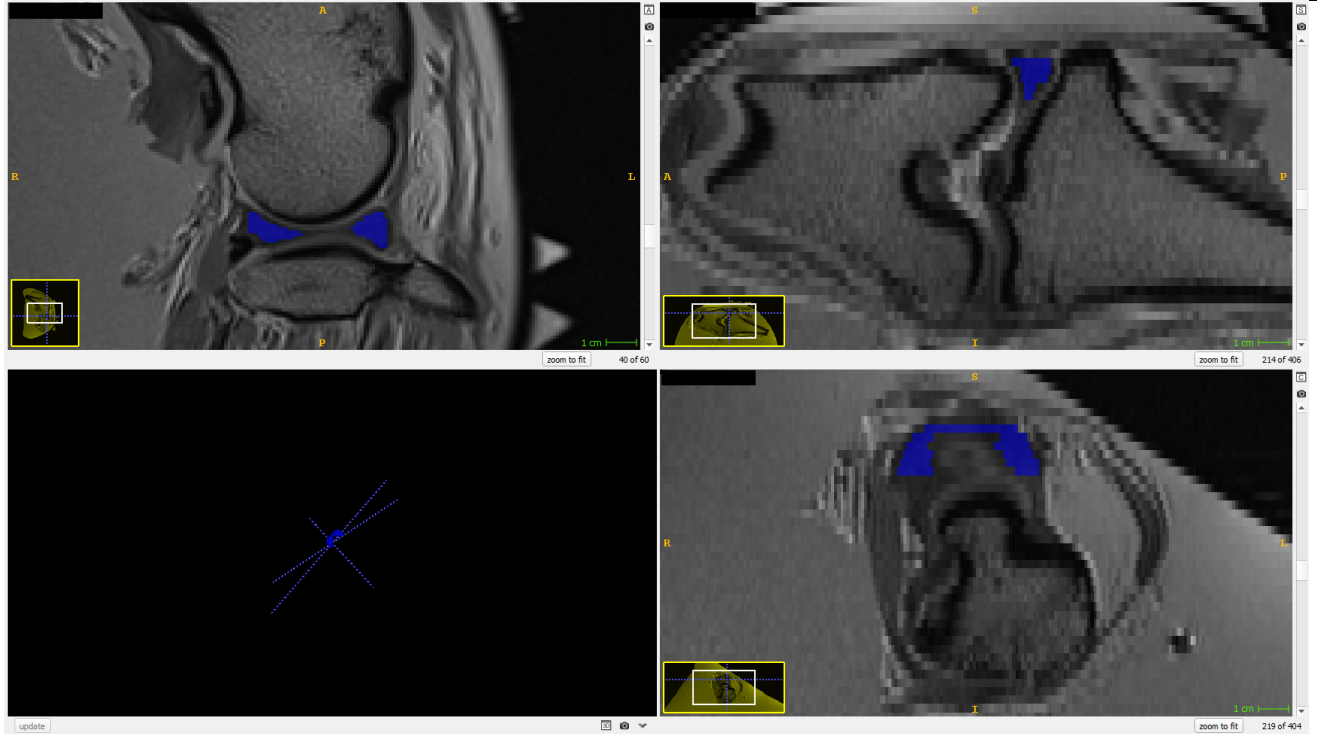
This research received no external funding.

## 9. Supplementary material

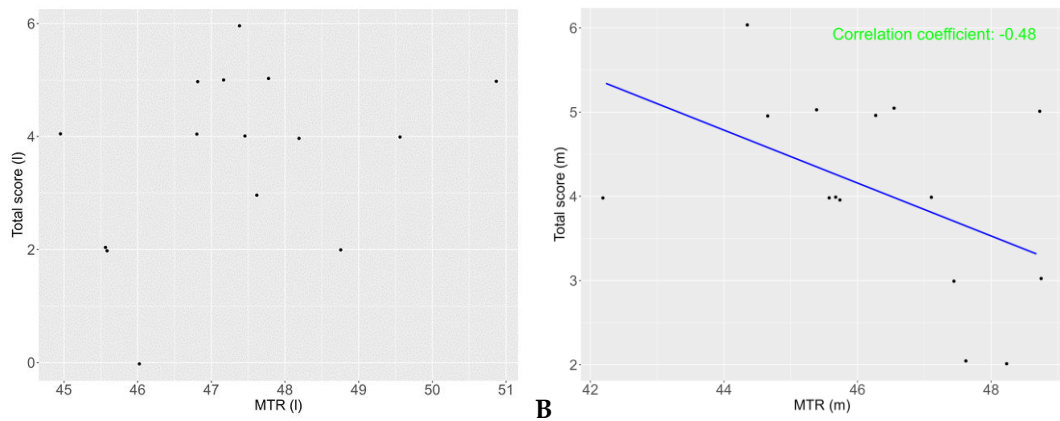
**Supplementary Table 1:** Mean values and standard deviations (SD) of the respective histology scores in the medial and lateral menisci. A paired t-test was applied to assess significant differences, and the corresponding p-values are provided.

Histology score	medial menisci (mean $\pm$ SD)	lateral menisci (mean $\pm$ SD)	p-value
Collagen content	1.1 $\pm$ 0.7	0.9 $\pm$ 0.7	0.43
Collagen organisation	1.1 $\pm$ 0.4	1.3 $\pm$ 0.6	0.19
Proteoglycan content	0.8 $\pm$ 0.7	0.3 $\pm$ 0.6	<b>0.006</b>

<b>Collagen-to-proteoglycan ratio</b>	1.4 ± 0.8	1.7 ± 0.8	0.1
<b>Cellularity</b>	1.1 ± 0.6	1.2 ± 0.5	0.72
<b>Total score</b>	4.1 ± 1.1	3.7 ± 1.5	0.31



Supplementary Figure 1: Example of the manual segmentation of the lateral meniscus using the software program ITK-SNAP ([www.itksnap.org](http://www.itksnap.org)).



**Supplementary Figure 2:** Relationship of the total score (sum of all four single histological scores) and magnetisation transfer ratio (MTR) in (A) the lateral (l) and (B) medial (m) menisci.

## 10. Data Availability statement

The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly accessible due to data protection.

## 11. References

1. Pownder, S.L.; Hayashi, K.; Caserto, B.G.; Breighner, R.E.; Norman, M.L.; Potter, H.G.; Koff, M.F. Quantitative Magnetic Resonance Imaging and Histological Comparison of Normal Canine Menisci. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.* **2018**, *31*, 452–457, doi:10.1055/s-0038-1668115.
2. McDermott, I. Meniscal tears, repairs and replacement: Their relevance to osteoarthritis of the knee. *Br. J. Sports Med.* **2011**, *45*, 292–297, doi:10.1136/bjsm.2010.081257.
3. Hu, J.; Xin, H.; Chen, Z.; Zhang, Q.; Peng, Y.; Jin, Z. The role of menisci in knee contact mechanics and secondary kinematics during human walking. *Clin. Biomech. (Bristol, Avon)* **2019**, *61*, 58–63, doi:10.1016/j.clinbiomech.2018.11.009.
4. Fox, A.J.S.; Wanivenhaus, F.; Burge, A.J.; Warren, R.F.; Rodeo, S.A. The human meniscus: A review of anatomy, function, injury, and advances in treatment. *Clin. Anat.* **2015**, *28*, 269–287, doi:10.1002/ca.22456.
5. Zarins, Z.A.; Bolbos, R.I.; Pialat, J.B.; Link, T.M.; Li, X.; Souza, R.B.; Majumdar, S. Cartilage and meniscus assessment using T1rho and T2 measurements in healthy subjects and patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **2010**, *18*, 1408–1416, doi:10.1016/j.joca.2010.07.012.
6. Lee, W.; Miller, E.Y.; Zhu, H.; Luetkemeyer, C.M.; Schneider, S.E.; Neu, C.P. High frame rate deformation analysis of knee cartilage by spiral dualMRI and relaxation mapping. *Magn. Reson. Med.* **2023**, *89*, 694–709, doi:10.1002/mrm.29487.
7. Welsch, G.H.; Apprich, S.; Zbyn, S.; Mamisch, T.C.; Mlynarik, V.; Scheffler, K.; Bieri, O.; Trattnig, S. Biochemical (T2, T2\* and magnetisation transfer ratio) MRI of knee cartilage: Feasibility at ultra-high field (7T) compared with high field (3T) strength. *Eur. Radiol.* **2011**, *21*, 1136–1143, doi:10.1007/s00330-010-2029-7.
8. Mittal, S.; Pradhan, G.; Singh, S.; Batra, R. T1 and T2 mapping of articular cartilage and menisci in early osteoarthritis of the knee using 3-Tesla magnetic resonance imaging. *Pol. J. Radiol.* **2019**, *84*, e549–e564, doi:10.5114/pjr.2019.91375.
9. Eijgenraam, S.M.; Bovendeert, F.A.T.; Verschueren, J.; van Tiel, J.; Bastiaansen-Jenniskens, Y.M.; Wesdorp, M.A.; Nasserinejad, K.; Meuffels, D.E.; Guenoun, J.; Klein, S.; et al. T2 mapping of the meniscus is a biomarker for early osteoarthritis. *Eur. Radiol.* **2019**, *29*, 5664–5672, doi:10.1007/s00330-019-06091-1.
10. Hofmann, F.C.; Neumann, J.; Heilmeier, U.; Joseph, G.B.; Nevitt, M.C.; McCulloch, C.E.; Link, T.M. Conservatively treated knee injury is associated with knee cartilage matrix degeneration measured with MRI-based T2 relaxation times: Data from the osteoarthritis initiative. *Skeletal Radiol.* **2018**, *47*, 93–106, doi:10.1007/s00256-017-2759-6.
11. Banjar, M.; Horiuchi, S.; Gedeon, D.N.; Yoshioka, H. Review of Quantitative Knee Articular Cartilage MR Imaging. *Magn. Reson. Med. Sci.* **2022**, *21*, 29–40, doi:10.2463/mrms.rev.2021-0052.

12. Zhang, X.; Ma, Y.-J.; Wei, Z.; Wu, M.; Ashir, A.; Jerban, S.; Li, S.; Chang, E.Y.; Du, J. Macromolecular fraction (MMF) from 3D ultrashort echo time cones magnetization transfer (3D UTE-Cones-MT) imaging predicts meniscal degeneration and knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **2021**, *29*, 1173–1180, doi:10.1016/j.joca.2021.04.004.
13. Labruyère, J.; Schwarz, T. CT and MRI in veterinary patients: An update on recent advances. *In Practice* **2013**, *35*, 546–563, doi:10.1136/inp.f6720.
14. Gavin, P.R. Growth of clinical veterinary magnetic resonance imaging. *Vet. Radiol. Ultrasound* **2011**, *52*, S2-4, doi:10.1111/j.1740-8261.2010.01779.x.
15. Arno, S.; Bell, C.P.; Xia, D.; Regatte, R.R.; Krasnokutsky, S.; Samuels, J.; Oh, C.; Abramson, S.; Walker, P.S. Relationship between meniscal integrity and risk factors for cartilage degeneration. *Knee* **2016**, *23*, 686–691, doi:10.1016/j.knee.2015.11.004.
16. Mosher, T.J.; Liu, Y.; Torok, C.M. Functional cartilage MRI T2 mapping: Evaluating the effect of age and training on knee cartilage response to running. *Osteoarthritis Cartilage* **2010**, *18*, 358–364, doi:10.1016/j.joca.2009.11.011.
17. Mamisch, T.C.; Hughes, T.; Mosher, T.J.; Mueller, C.; Trattnig, S.; Boesch, C.; Welsch, G.H. T2 star relaxation times for assessment of articular cartilage at 3 T: A feasibility study. *Skeletal Radiol.* **2012**, *41*, 287–292, doi:10.1007/s00256-011-1171-x.
18. Li, X.; Han, E.T.; Ma, C.B.; Link, T.M.; Newitt, D.C.; Majumdar, S. In vivo 3T spiral imaging based multi-slice T(1rho) mapping of knee cartilage in osteoarthritis. *Magn. Reson. Med.* **2005**, *54*, 929–936, doi:10.1002/mrm.20609.
19. Hontoir, F.; Pirson, R.; Simon, V.; Clegg, P.; Nisolle, J.-F.; Kirschvink, N.; Vandeweerdt, J.-M.E. Age-related morphometric changes of the tidemark in the ovine stifle. *Anat. Histol. Embryol.* **2019**, *48*, 366–374, doi:10.1111/ahe.12449.
20. Pownder, S.L.; Hayashi, K.; Caserto, B.G.; Norman, M.L.; Potter, H.G.; Koff, M.F. Magnetic Resonance Imaging T2 Values of Stifle Articular Cartilage in Normal Beagles. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.* **2018**, *31*, 108–113, doi:10.3415/VCOT-17-03-0093.
21. Harper, T.A.M.; Jones, J.C.; Saunders, G.K.; Daniel, G.B.; Leroith, T.; Rossmeissl, E. Sensitivity of low-field T2 images for detecting the presence and severity of histopathologic meniscal lesions in dogs. *Vet. Radiol. Ultrasound* **2011**, *52*, 428–435, doi:10.1111/j.1740-8261.2011.01818.x.
22. Bunzendahl, L.; Moussavi, A.; Bleyer, M.; Dehnert, J.; Boretius, S.; Neumann, S. Histological Findings and T2 Relaxation Time in Canine Menisci of Elderly Dogs-An Ex Vivo Study in Stifle Joints. *Vet. Sci.* **2023**, *10*, doi:10.3390/vetsci10030182.
23. McDevitt, C.A.; Webber, R.J. The ultrastructure and biochemistry of meniscal cartilage. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **1990**, 8–18.

24. AufderHeide, A.C.; Athanasiou, K.A. Mechanical stimulation toward tissue engineering of the knee meniscus. *Ann. Biomed. Eng.* **2004**, *32*, 1161–1174, doi:10.1114/b:abme.0000036652.31658.f3.
25. Aidos, L.; Modina, S.C.; Millar, V.R.H.; Peretti, G.M.; Mangiavini, L.; Ferroni, M.; Boschetti, F.; Di Giancamillo, A. Meniscus Matrix Structural and Biomechanical Evaluation: Age-Dependent Properties in a Swine Model. *Bioengineering (Basel)* **2022**, *9*, doi:10.3390/bioengineering9030117.
26. Abraham, A.C.; Edwards, C.R.; Odegard, G.M.; Donahue, T.L.H. Regional and fiber orientation dependent shear properties and anisotropy of bovine meniscus. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2011**, *4*, 2024–2030, doi:10.1016/j.jmbbm.2011.06.022.
27. Nebelung, S.; Tingart, M.; Pufe, T.; Kuhl, C.; Jahr, H.; Truhn, D. Ex vivo quantitative multiparametric MRI mapping of human meniscus degeneration. *Skeletal Radiol.* **2016**, *45*, 1649–1660, doi:10.1007/s00256-016-2480-x.
28. Williams, A.; Qian, Y.; Golla, S.; Chu, C.R. UTE-T2\* mapping detects sub-clinical meniscus injury after anterior cruciate ligament tear. *Osteoarthritis Cartilage* **2012**, *20*, 486–494, doi:10.1016/j.joca.2012.01.009.
29. Koff, M.F.; Shah, P.; Pownder, S.; Romero, B.; Williams, R.; Gilbert, S.; Maher, S.; Fortier, L.A.; Rodeo, S.A.; Potter, H.G. Correlation of meniscal T2\* with multiphoton microscopy, and change of articular cartilage T2 in an ovine model of meniscal repair. *Osteoarthritis Cartilage* **2013**, *21*, 1083–1091, doi:10.1016/j.joca.2013.04.020.
30. Li, W.; Hong, L.; Hu, L.; Magin, R.L. Magnetization transfer imaging provides a quantitative measure of chondrogenic differentiation and tissue development. *Tissue Eng. Part C Methods* **2010**, *16*, 1407–1415, doi:10.1089/ten.tec.2009.0777.
31. Berg, R.C.; Leutritz, T.; Weiskopf, N.; Preibisch, C. Multi-parameter quantitative mapping of R1, R2\*, PD, and MTsat is reproducible when accelerated with Compressed SENSE. *Neuroimage* **2022**, *253*, 119092, doi:10.1016/j.neuroimage.2022.119092.
32. Tofts, P. Quantitative MRI of the Brain: Measuring Changes Caused by Disease **2003**, doi:10.1002/0470869526.
33. Son, M.; Goodman, S.B.; Chen, W.; Hargreaves, B.A.; Gold, G.E.; Levenston, M.E. Regional variation in T1ρ and T2 times in osteoarthritic human menisci: Correlation with mechanical properties and matrix composition. *Osteoarthritis Cartilage* **2013**, *21*, 796–805, doi:10.1016/j.joca.2013.03.002.
34. Noeske, R. *Anwendung der Hochfeld-(3-Tesla)-NMR-Tomographie*; Freie Universität Berlin, 2000.
35. Regatte, R.R.; Akella, S.V.S.; Wheaton, A.J.; Lech, G.; Borthakur, A.; Kneeland, J.B.; Reddy, R. 3D-T1ρ-relaxation mapping of articular cartilage: In vivo assessment of early degenerative changes in symptomatic osteoarthritic subjects. *Acad. Radiol.* **2004**, *11*, 741–749, doi:10.1016/j.acra.2004.03.051.

- 36.Brandt, K.D.; Radin, E.L.; Dieppe, P.A.; van de Putte, L. Yet more evidence that osteoarthritis is not a cartilage disease. *Ann. Rheum. Dis.* **2006**, *65*, 1261–1264, doi:10.1136/ard.2006.058347.
- 37.Mehta, R.C.; Pike, G.B.; Enzmann, D.R. Improved detection of enhancing and nonenhancing lesions of multiple sclerosis with magnetization transfer. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* **1995**, *16*, 1771–1778.
- 38.Ropele, S.; Fazekas, F. Magnetization transfer MR imaging in multiple sclerosis. *Neuroimaging Clin. N. Am.* **2009**, *19*, 27–36, doi:10.1016/j.nic.2008.09.004.
- 39.Gray, M.L.; Burstein, D.; Lesperance, L.M.; Gehrke, L. Magnetization transfer in cartilage and its constituent macromolecules. *Magn. Reson. Med.* **1995**, *34*, 319–325, doi:10.1002/mrm.1910340307.
- 40.Olsson, H.; Andersen, M.; Wirestam, R.; Helms, G. Mapping magnetization transfer saturation (MTsat) in human brain at 7T: Protocol optimization under specific absorption rate constraints. *Magn. Reson. Med.* **2021**, *86*, 2562–2576, doi:10.1002/mrm.28899.
- 41.Helms, G.; Dathe, H.; Kallenberg, K.; Dechent, P. High-resolution maps of magnetization transfer with inherent correction for RF inhomogeneity and T1 relaxation obtained from 3D FLASH MRI. *Magn. Reson. Med.* **2008**, *60*, 1396–1407, doi:10.1002/mrm.21732.
- 42.Grabher, P.; Callaghan, M.F.; Ashburner, J.; Weiskopf, N.; Thompson, A.J.; Curt, A.; Freund, P. Tracking sensory system atrophy and outcome prediction in spinal cord injury. *Annals of Neurology* **2015**, *78*, 751–761, doi:10.1002/ana.24508.
- 43.Lema, A.; Bishop, C.; Malik, O.; Mattoscio, M.; Ali, R.; Nicholas, R.; Muraro, P.A.; Matthews, P.M.; Waldman, A.D.; Newbould, R.D. A Comparison of Magnetization Transfer Methods to Assess Brain and Cervical Cord Microstructure in Multiple Sclerosis. *Journal of Neuroimaging* **2017**, *27*, 221–226, doi:10.1111/jon.12377.
- 44.Leutritz, T.; Seif, M.; Helms, G.; Samson, R.S.; Curt, A.; Freund, P.; Weiskopf, N. Multiparameter mapping of relaxation (R1, R2\*), proton density and magnetization transfer saturation at 3 T: A multicenter dual-vendor reproducibility and repeatability study. *Human Brain Mapping* **2020**, *41*, 4232–4247, doi:10.1002/hbm.25122.
- 45.Weiskopf, N.; Suckling, J.; Williams, G.; Correia, M.M.; Inkster, B.; Tait, R.; Ooi, C.; Bullmore, E.T.; Lutti, A. Quantitative multi-parameter mapping of R1, PD\*, MT, and R2\* at 3T: A multi-center validation. *Front. Neurosci.* **2013**, *7*, doi:10.3389/fnins.2013.00095.
- 46.Diekmann, H.U. Analysis of the pathogenesis and progression of osteoarthritis in canine stifle joints considering three bone healing markers.
- 47.Kellgren, J.H.; Lawrence, J.S. Radiological assessment of osteo-arthrosis. *Ann. Rheum. Dis.* **1957**, *16*, 494–502, doi:10.1136/ard.16.4.494.

48. Sun, Y.; Mauerhan, D.R.; Kneisl, J.S.; James Norton, H.; Zinchenko, N.; Ingram, J.; Hanley, E.N.; Gruber, H.E. Histological examination of collagen and proteoglycan changes in osteoarthritic menisci. *Open Rheumatol. J.* **2012**, *6*, 24–32, doi:10.2174/1874312901206010024.
49. Pauli, C.; Grogan, S.P.; Patil, S.; Otsuki, S.; Hasegawa, A.; Koziol, J.; Lotz, M.K.; D'Lima, D.D. Macroscopic and histopathologic analysis of human knee menisci in aging and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **2011**, *19*, 1132–1141, doi:10.1016/j.joca.2011.05.008.
50. Flo, G.L. Meniscal injuries. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* **1993**, *23*, 831–843, doi:10.1016/s0195-5616(93)50085-2.
51. Henkelman, R.M.; Stanisz, G.J.; Graham, S.J. Magnetization transfer in MRI: A review. *NMR Biomed.* **2001**, *14*, 57–64, doi:10.1002/nbm.683.
52. López-Franco, M.; Gómez-Barrena, E. Cellular and molecular meniscal changes in the degenerative knee: A review. *J. Exp. Orthop.* **2018**, *5*, 11, doi:10.1186/s40634-018-0126-8.
53. Krupkova, O.; Smolders, L.; Wuertz-Kozak, K.; Cook, J.; Pozzi, A. The Pathobiology of the Meniscus: A Comparison Between the Human and Dog. *Front. Vet. Sci.* **2018**, *5*, 73, doi:10.3389/fvets.2018.00073.

#### 4. Übergreifende Diskussion

Die vorliegende *ex-vivo* Studie befasste sich mit den histologischen Veränderungen und der Anwendung semi-quantitativer MR-Bildgebung an caninen Kniegelenken. In der ersten Studie wurden Menisken aus 16 Kniegelenken von acht älteren, lahmfreien Hunden untersucht. Nur klinisch unauffällige Hunde mit einem Röntgenscore von 0 bis 1 und einem Gewicht zwischen 15 und 30 kg wurden eingeschlossen. Diese Kriterien ergaben sich daher, dass aus den zur Verfügung stehenden Kadavern eine möglichst einheitliche Studienpopulation geschaffen werden sollte. In der zweiten Studie musste ein Gelenk aufgrund technischer Fehler bei der Bildaufnahme exkludiert werden.

Untersucht wurden die T1-, T2-, T2\*- Relaxationszeit und der MT in Form der MTR und des MTsat. Die Ergebnisse beider Studien zeigen, dass die semi-quantitative MR-Bildgebung sehr herausfordernd ist und noch weitere Untersuchungen zur Validierung und Interpretation der Ergebnisse notwendig sind. Es wird jedoch auch deutlich, dass vor allem die T1-Relaxationszeit und MTsat vielversprechende Biomarker zur Charakterisierung der extrazellulären Matrix der Menisken sein könnten. Beide Parameter zeigten Korrelationen mit einigen histologischen Parametern. Dahingegen konnten wir keine Korrelationen der T2- und T2\*-Relaxationszeit und der MTR mit den Ergebnissen der histologischen Parameter feststellen. Die hier vorliegenden Untersuchungen sind als "Pilotstudien" zu verstehen, die einen ersten Eindruck für die Anwendung dieser Techniken im veterinärmedizinischen Bereich geben. Zudem können solche Studien als Modell für Anwendungen in der Humanmedizin dienen. Grundsätzlich sind hier sicherlich weitergehende Untersuchungen zur Validierung unserer Ergebnisse notwendig. Es sollten Untersuchungen ergänzt werden, um physiologische und pathologische Richt- bzw. Normalwerte zur Beurteilung der Menisken und deren mikrostruktureller Zusammensetzung definieren zu können. Dafür sollten die hier erfolgten Untersuchungen mit einer größeren Studienpopulation wiederholt werden. Außerdem wäre es sinnvoll, Tiere mit höherem Arthrosegrad mit gesunden Tieren zu vergleichen. Deutliche Degenerationen, wie sie bei höheren Arthrosegrade vorliegen, können leichter mittels Bildgebung detektiert werden und der Vergleich mit gesunden Tieren könnte zu statistisch aussagekräftigeren Ergebnissen führen.

#### 4.1. Diskussion der angewandten Methoden

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass es mit quantitativer und semi-quantitativer MRT gelingen kann, (mikro-)strukturelle Veränderungen verschiedener Gewebe zu detektieren. Es konnten Veränderungen der  $T1\rho$  und T2 in humanem Knorpel und Menisken bei Patienten mit Kreuzbandriss bzw. Osteoarthritis gezeigt werden (ZARINS et al., 2010; WANG et al., 2016; MITTAL et al., 2019). Es konnten beispielweise auch Korrelationen zwischen T1,  $T1\rho$  und T2 mit dem histologischen Williamsscore gezeigt werden (BAUM et al., 2013), (NEBELUNG et al., 2016; EIJGENRAAM et al., 2019).

Ein erster Diskussionspunkt ist sicherlich die Studienpopulation. Wir konnten ausschließlich Hunde für diese Studie nutzen, die aufgrund anderer Erkrankungen in der Klinik verstorben sind oder euthanasiert wurden. Daraus ergab sich eine gemischtgeschlechtliche, ältere (>10 Jahre) Hundepopulation bestehend aus verschiedenen Rassen. Es lag außerdem eine heterogene Verteilung von Körpergröße und Körpergewicht vor. Neben dieser vorliegenden Inhomogenität innerhalb der Studienpopulation, konnten wir ausschließlich Kadaver generieren, die nur geringe röntgenologische Veränderungen im Kniegelenk aufwiesen. Die untersuchten Gelenke zeigten also entweder keine oder maximal geringe Anzeichen von Degenerationen. Dies führte wiederum dazu, dass die histologischen und radiologischen Unterschiede zwischen den einzelnen Hunden und Gelenken nur sehr gering waren. Vorteilhafter wäre sicherlich eine vergleichende Untersuchung zwischen einer Gesundheitsgruppe und einer deutlich an Arthritis erkrankten Gruppe gewesen. Diese Vorgehensweise könnte insgesamt zu aussagekräftigeren Ergebnissen führen. Powder et al. (2018) hat beispielsweise die Kniegelenke von 7 gesunden männlichen Beaglehunden untersucht und damit eine sehr homogene, wenn auch ebenfalls sehr kleine, Studienpopulation. Hontoir et al. (2019) führten histologische Untersuchungen an ovinen Kniegelenken durch. Sie untersuchten insgesamt 80 Rinder, hatten also eine deutlich größere Studienpopulation.

Grundsätzlich findet man deutlich mehr humane Studien, die teils nur bildgebende Untersuchungen gemacht haben und teils auch histologische Untersuchungen ergänzten.

Regatte et al. (2004) untersuchten die  $T1\rho$ -Relaxation zur Detektion früher Knorpelveränderungen bei symptomatischen und asymptomatischen Erwachsenen mit Osteoarthritis im Femoropatellargelenk. Mit insgesamt 14 Probanden war die Studienpopulation von der Größe vergleichbar mit unserer Gruppengröße. Untersucht wurde hier ausschließlich mittels MRT, eine histologische Kontrolle erfolgte nicht.

Mittal et al. (2019) untersuchten Matrixveränderungen des Gelenkknorpels und der Menisken bei gesunden humanen Patienten und Patienten mit Osteoarthritis mittels T1- und T2-Relaxation. Es wurden 25 Patienten in der Krankgruppe und 10 Probanden in der

Gesundgruppe untersucht. Die Studienpopulation war also ebenfalls sehr klein. Ähnlich unserer Studie wurden nur Patienten mit geringem Osteoarthrosegrad (Kellgren-Lawrence-Grad 1 und 2) in die Studie eingeschlossen. Außerdem fand ebenfalls der Kellgren-Lawrence-Score zur Beurteilung des Arthrosegades Anwendung. In dieser Studie wurden wie bei Regatte et al. (2004) ausschließlich bilgebende Daten erfasst. Eine Korrelation mit histologischen Untersuchungen erfolgte also nicht. Die T1- und T2-Relaxationszeit wurden nicht nur für die Menisken, sondern auch für den Gelenkknorpel bestimmt. Zusätzlich fand, im Gegensatz zu unserer Studie, noch eine morphologische Beurteilung dieser beiden Strukturen mittels MRT statt.

Auch Nebelung et al. (2016) untersuchten den diagnostischen Nutzen verschiedener MR-Parameter im Rahmen von Meniskusdegenerationen beim Menschen. Ähnlich unserer Studie fanden multiparametrische MRT-Untersuchungen statt. Gemessen wurden T1, T1<sub>p</sub>, T2, T2\* und UTE-T2\*. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Untersuchungen, handelt es sich hier, wie auch bei uns, um eine *ex-vivo* Studie. Untersucht wurde auch hier nur eine geringe Anzahl an Menisken (n=24). Diese stammten von Patienten, die eine Totalendoprothese des Kniegelenkes erhalten haben. Die MRT-Untersuchung erfolgte nach Entnahme der Menisken. Diese wurden in einem speziellen Serum bei 4°C aufbewahrt.

Die Art der Präparation und auch die Aufbewahrung der Proben sind ein weiterer diskussionswürdiger Punkt. Sie können die Ergebnisse maßgeblich beeinflussen. Grundsätzlich wurden die Kniegelenke in unseren Studien als Ganzes aus den Kadavern entnommen. Die Aufbewahrung erfolgte nicht in einem speziellen Serum, sondern in einem mit 10%igem Formalin gefüllten Gefäß. Außerdem wurde unter Luftabschluss zusätzlich Formalin in das jeweilige Gelenk injiziert. Formalin hat einen starken Einfluss auf den Hydratationsstatus des Gewebes, was wiederum Auswirkungen auf die Ergebnisse haben kann. Die T1- und T2-Relaxation verhalten sich beispielsweise proportional zur Verringerung des Wassergehaltes in Formalin-fixierten Proben des Herzmuskels (EBATA et al., 2021). (CHAN et al., 2022) untersuchten beispielsweise die Auswirkungen von Formalinfixierung der weißen Substanz des Gehirns. Die Ergebnisse zeigten, dass Formalin-fixierte Proben eine ähnliche magnetische Suszeptibilität aufweisen, Vergleiche mit nicht-fixierten Proben jedoch mit Vorsicht betrachtet werden müssen. Formalin kann außerdem dazu führen, dass die Bilder ein stärkeres Rauschen aufweisen (DUSEK et al., 2019). Studien zu Veränderungen der MR-Parameter durch Formalin-Fixierung für muskuloskeletale Strukturen sind nach unserem Wissen aktuell nicht beschrieben.

Die meisten Studien haben die Menisken *in-vivo* mittels MRT untersucht (NEBELUNG et al., 2016; MITTAL et al., 2019; ZHANG et al., 2021). Nebelung et al. (2019) und Powder et al. (2018) haben die Menisken *ex-vivo* in gekühltem Zustand untersucht. Daher gibt es keine

vergleichbaren Studien, die Formalin-fixierte Menisken mittels MRT untersucht haben. In unseren Studien wurden außerdem die Gelenke in toto im MRT untersucht. Die Menisken wurden erst nach der Bildgebung für die histologische Untersuchung präpariert.

Zur histologischen Beurteilung der untersuchten Menisken fand ein modifizierter Score nach (SUN et al., 2012) und (PAULI et al., 2011) Anwendung. Diese untersuchten humane Kniegelenksmenisken und beschrieben histologische Veränderungen, die im Rahmen der Arthrose auftraten. Beispiele für derartige Degenerationen sind ein veränderter Kollagen- und Proteoglykangehalt. Auch unsere histologischen Untersuchungen zeigten Unterschiede im Kollagen- und Proteoglykangehalt. Mit steigendem Osteoarthrosegrad nahm beispielsweise der Kollagengehalt ab.

Für unsere Untersuchungen wurden die Menisken, wie bereits erwähnt, zunächst aus den Gelenken präpariert und erneut in 10%igem Formalin aufbewahrt. Auch wenn diese Präparation unter größter Vorsicht erfolgte, können gewisse präparationsbedingte Artefakte nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Strukturelle Schäden, beispielsweise durch Quetschungen mittels Pinzette etc., könnten zu einer veränderten Auswertung hinsichtlich der Kollagenorganisation führen. Vor allem, wenn Artefakte und Degenerationen durch den Untersucher nicht sicher zu differenzieren sind.

Zur histologischen Beurteilung der Menisken bezüglich Zellularität, Kollagen- und Proteoglykangehalt und Kollagenorganisation, wurden anschließend verschiedene Färbungen angewendet. Die Ergebnisse dieser Parameter wurden zu einem Gesamtscore addiert. (PAULI et al., 2011; SUN et al., 2012). Zu beachten ist, dass die Anzahl der ausgewerteten Schnitte in unserer Studie etwas von denen, die von Pauli et al (2011) und Sun et al (2012) ausgewertet wurden, abweicht. Es wurde nur ein Schnitt pro Meniskus ausgewertet. Andere Studien unterscheiden die anatomischen Lokalisationen der Menisken genauer, indem sie beispielsweise Vorder- und Hinterhorn und Mittelteil der Menisken separat betrachten. Sun et al. (2012) beurteilten histologisch mehrere Transversalschnitte des Meniskus. Dass man durchwegs Unterschiede zwischen den einzelnen Meniskusregionen feststellen kann, zeigen einige Studien (SUN et al., 2012; NEBELUNG et al., 2016, NEBELUNG et al., 2016; POWNDER et al., 2018; POWNDER et al., 2018; POWNDER et al., 2018). Pownder et al. (2018) fanden beispielsweise längere T2\*-Werte im Hinterhorn des medialen Meniskus (POWNDER et al., 2018). Je mehr Schnitte untersucht werden, desto mehr Daten erhält man über den genauen histologischen Zustand des Gewebes. Daher ist eine Untersuchung von mehreren Abschnitten in jedem Fall der Untersuchung nur eines Längsschnittes vorzuziehen.

Desweiteren kann nicht nur zwischen Vorder- Hinterhorn und Mittelteil differenziert werden, sondern auch zwischen Meniskusoberfläche und tieferen Schichten und zwischen Kollagen-Typ-I und Kollagen-Typ-II (PAULI et al., 2011; SUN et al., 2012). Die histologische Beurteilung

war in unseren Studien somit weniger detailreich. Durch Auswertung jeweils eines Schnittes haben wir nur einen Überblick über das Gewebe erhalten und eine weniger detaillierte Beurteilung durchgeführt, als andere Studien. Da es sich hier zunächst um eine Art Pilotstudie handelte, waren sowohl der Arbeits- als auch der Kostenaufwand dahingehend limitiert, dass wir nur einen Schnitt pro Meniskus ausgewertet haben.

Unser Studiendesign ähnelt einigen Veröffentlichungen aus der Humanmedizin. Einige Studien haben jedoch ausschließlich bildgebende Parameter oder histologische Parameter untersucht (REGATTE et al., 2004; HONTOIR et al., 2019). Eine Studie, die ebenfalls MRT-Daten und histologische Daten miteinander verglich, ist die von Eijgenraam et al. (2019). Dort wurden die T2-Werte mit histologischen Scores von humanen Kniegelenksmenisken bei Patienten verglichen, die aufgrund einer Gonarthrose einen Kniegelenksersatz erhalten haben.

Wir haben in unseren Studien verschiedene MR Sequenzen bzw. Kontraste genutzt, um canine Menisken des Kniegelenkes zu untersuchen. Um den tatsächlichen Degenerationsgrad der Menisken beurteilen und mit den Ergebnissen der Bildgebung vergleichen zu können, wurden die Menisken zusätzlich histologisch untersucht. Auch Nebelung et al. (2016) und Powder et al. (2018a) untersuchten Menisken mittels MRT und verglichen die Ergebnisse mit der Histologie.

Im Bereich der Veterinärmedizin gibt es insgesamt bisher nur wenige Untersuchungen zur semi-quantitativen MR-Bildgebung des Meniskus. Powder et al. (2018a) untersuchte mittels T2\* canine Kniegelenksmenisken. In dieser Studie wurden ausschließlich gesunde Menisken untersucht und Normalwerte für die einzelnen anatomischen Lokalisationen der Menisken beschrieben.

Die Untersuchung der Menisken mittels MRT in unserer Studie findet sich unseres Wissens nach so noch nicht in der Literatur. Mittels semi-quantitativer Bildgebung wurden von uns verschiedene MR-Parameter untersucht. Es wurden die T1-, T2-, T2\*-Relaxationszeit und der Magnetisierungstransfer in Form der MTR und des MTsat untersucht.

T2 und T2\* wurden schon in einigen human- und wenigen veterinärmedizinischen Studien zur Untersuchung artikulärer Strukturen angewendet (MOSHER u. DARDZINSKI, 2004; REGATTE et al., 2004; LI et al., 2005; NEBELUNG et al., 2016; POWNDER et al., 2018; MITTAL et al., 2019). Der Magnetisierungstransfer hingegen wurde wenig im Bereich der Orthopädie untersucht (LI et al., 2010; ZHANG et al., 2021).

Die T2-Relaxationszeit wurde schon in zahlreichen Studien zur Untersuchung von intraartikulären Strukturen genutzt. Sie kann die Integrität der Wasserstoff-Moleküle und auch

den Wassergehalt des Gewebes widerspiegeln (LIESS et al., 2002; MOSHER u. DARDZINSKI, 2004; HONTOIR et al., 2015). Diese Parameter werden durch pathologische Vorgänge beeinflusst, sodass die T2-Relaxationszeit als früher Biomarker solcher Veränderungen nützlich sein kann (HONTOIR et al., 2015).

Der Magnetisierungstransfer wurde bisher wenig zur Untersuchung muskuloskeletaler Strukturen angewendet. Zhang et al. (2021) untersuchten humane Menisken von gesunden Patienten und Patienten mit Osteoarthritis mittels MTR. Canine Menisken wurden nach aktuellem Wissensstand noch nicht mit diesem Parameter untersucht. Eine Studie wurde veröffentlicht, in der der Gelenkknorpel mittels MTR untersucht wurde.

Grundsätzlich muss unbedingt bedacht werden, dass es sich bei unserer Studie um eine *ex-vivo* Studie handelt. Die Ergebnisse der MR-Untersuchung müssen also kritisch betrachtet werden. Die MR-Werte können vor allem in *ex-vivo* Untersuchungen durch verschiedenste Faktoren beeinflusst werden. Beispielsweise hat die Temperatur einen großen Einfluss auf die T2-Relaxationszeit. In unserem Fall wurden die Gelenke bei Raumtemperatur untersucht. Die Temperatur lag also unterhalb der *in-vivo* vorliegenden Körpertemperatur. Diese Temperaturunterschiede können z.B. zu Veränderungen der Signalintensität führen. Die Protonendichte verhält sich umgekehrt proportional zur Gewebetemperatur und eine geringere Dichte führt zu einem geringeren Signal. Auch die T1-Relaxation wird von der Gewebetemperatur beeinflusst, da die Energieaustauschrate innerhalb und zwischen den Wassermolekülen mit steigender Temperatur zunimmt (ODÉEN u. PARKER, 2019). Außerdem unterscheiden sich die Bildaufnahmeparameter häufig zwischen *in-* und *ex-vivo* Studien. Die Anzahl der genutzten Echos, die verwendeten Echozeiten und auch das Sichtfeld können variieren (VAN TIEL et al., 2016; NEBELUNG et al., 2016). Die in dieser Studie genutzten Parameter erfordern (in Summe) eine sehr lange Aufnahmezeit von einigen Stunden, die so nicht in die klinische Anwendung übertragen werden könnte. *In-vivo* werden häufig kürzere Echozeiten genutzt, um die Scanzeit zu minimieren und eventuelle Bewegungsartefakte zu minimieren. *Ex-vivo* sind deutlich längere Scanzeiten möglich, sodass multiple Echos genutzt werden können. Dies resultiert in einer kontrastreicherer Darstellung und höheren räumlichen Auflösung. Das Sichtfeld kann in *ex-vivo* Untersuchungen deutlich kleiner gewählt werden, mit höherer Matrixauflösung, um eine möglichst detaillierte Abbildung zu erreichen.

## 4.2. Diskussion der Ergebnisse

Die Ergebnisse unserer Studien zeigen, dass die strukturelle bzw. semi-quantitative Bildgebung der Menisken und die Interpretation der erhaltenen Bilddaten noch nicht ausgereift sind. Allgemein ist die Darstellung der Menisken vor allem durch ihre kurze T2-Relaxationszeit schwierig. Sie sind dadurch deutlich weniger signalgebend als beispielsweise der Gelenkknorpel (AFSAHI et al., 2022). Durch ihren geringen Wassergehalt, ein besonders straffes Kollagennetzwerk und eine eingeschränkte Protonenbeweglichkeit, kommt es aufgrund der kurzen T2- und T2\*-Relaxationszeiten schnell zu einer Signalabschwächung (WILLIAMS et al., 2012; NEBELUNG et al., 2016). Sowohl die T2- und die T2\*-Relaxation, aber auch die MTR haben in unseren Arbeiten nicht signifikant mit den Ergebnissen der histologischen Untersuchungen korreliert. Nur für die T1-Relaxationszeit und MTsat konnte ein Zusammenhang mit dem Proteoglykangehalt und im Falle der T1-Relaxationszeit auch mit der Zellularität gezeigt werden. Zusätzlich dazu, konnten wir zeigen, dass eine verlängerte Echozeit in der Gradientenecho-Sequenz (GRE) zu einem verbesserten Kontrast zwischen dem hyalinen Gelenkknorpel und dem Faserknorpel der Menisken führt. Übermäßig lange Echozeiten (TE) führten dahingegen zu einer unzureichenden Signalintensität. Auch in der Literatur ist beschrieben, dass muskuloskeletale Strukturen grundsätzlich besser mit kurzen Echozeiten abgebildet werden können, da es bei längeren Echozeiten zu einem Signalverlust kommt (AFSAHI et al., 2022). Grundsätzlich waren die MTR- und MTsat-Werte der Menisken höher als die des hyalinen Knorpels. Ursächlich dafür könnte die dichtere Kollagenstruktur sein. Dieser Kontrastmechanismus kann eine vielversprechende Möglichkeit sein, die beiden Strukturen besser voneinander abzugrenzen.

Bezüglich der mangelnden Korrelation zwischen T2\* und den histologischen Parametern stimmen unsere Ergebnisse mit denen aus der Studie von Nebelung et al. (2016) überein. Hier fand zur histologischen Bewertung der sogenannte Williams-Score Anwendung, welcher beispielsweise auch die Zellularität und Matrixorganisation bewertet. Sie konnten beispielsweise zeigen, dass T1 und T2 sensitiiv für Veränderungen im Meniskusgewebe sind. T2\* hingegen war laut ihren Ergebnissen weniger geeignet. Nebelung et al. (2016) begründen die Ergebnisse damit, dass T2\* grundsätzlich anfälliger für Artefakte aufgrund von Magnetfeldinhomogenitäten ist. Dies spiegelt sich auch in der Literatur wider, wo häufig deutlich höhere Standardabweichungen für T2\* im Vergleich zu T2 beschrieben sind (KIM et al., 2014; NEBELUNG et al., 2016).

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen, konnten andere Studien hingegen zeigen, dass die T1-, T2- und T2\*-Relaxationszeit potentielle Biomarker für strukturelle Veränderungen der Menisken sein könnten. Mittal. et al. (2019) zeigten beispielsweise, dass die T2-Relaxationszeit Veränderungen in der biochemischen Zusammensetzung der Menisken

detektieren kann. Die Autoren vermuten, dass T2-Werte empfindlich auf die Interaktion zwischen den Wassermolekülen und dem Kollagennetzwerk reagieren, aber keine Veränderungen des Proteoglykan-Gehalts widerspiegeln können. Für Veränderungen des Proteoglykan-Gehaltes zeigte die T1-Relaxation in ihrer Studie bessere Ergebnisse. Auch Eijgenraam et al. (2019) konnten mit ihren Ergebnissen eine Korrelation zwischen T2-Relaxation und histologischem Score bei humanen Kniegelenksmenisken zeigen.

(KOFF et al., 2013) korrelierten die T2\*-Relaxationszeit des Meniskus mit quantitativen mikroskopischen Methoden bei Schafen mit iatrogen induzierten Meniskusrissen. Die Untersuchungen erfolgten 6 Wochen post Operationem. Die Autoren kamen hier zu dem Schluss, dass der untersuchte Parameter Unterschiede in der Meniskusstruktur und --zusammensetzung erkennen kann. Nebelung et al. (2016) hingegen fand -wie bereits erwähnt- keine signifikante Korrelation zwischen den T2\*-Werten und den histologischen Veränderungen humaner Menisken.

Rauscher et al. (2008), Zarins et al. (2010) und Wang et al. (2016) schlussfolgerten anhand ihrer Ergebnisse, dass semiquantitative MR-Parameter es ermöglichen, degenerative Veränderungen der Menisken zu detektieren und semiquantitativ zu beschreiben. Rauscher et al. (2008) konnten signifikante Unterschiede in der T1 $\rho$ - und T2-Relaxation zwischen Patienten ohne Osteoarthritis und mit mildem bzw. schwerem Osteoarthritisgrad zeigen. Zarins et al. (2010) konnten ebenfalls verlängerte T1 $\rho$ - und T2-Relaxationen bei Patienten mit Meniskusdegenerationen finden. Signifikante Unterschiede konnten sie jedoch nur bei stärkerer Degeneration feststellen. Wang et al. (2016) konnten auch eine signifikante Verlängerung von T1 $\rho$ - und T2-Relaxation feststellen. Sie untersuchten Menisken bei Patienten mit Kreuzbandruptur. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen und denen von Zarins et al. (2010), konnten sie auch bei geringen Degenerationen signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe zeigen. Auch Regatte et al. (2004) konnten eine verlängerte T1 $\rho$ -Relaxation bei Patienten mit symptomatischer Osteoarthritis feststellen.

Li et al. (2010) untersuchten den Magnetisierungstransfer (MT) als nicht-invasive Evaluierungsmethode für künstlichen Knorpel. Sie fanden einen signifikanten Anstieg des MT, der mit einer Zunahme der Glykosaminoglycane (GAG) korreliert war. Im Gegensatz zum Gelenkknorpel ist nicht wirklich geklärt, ob der Gehalt an GAG in caninen Menisken im Falle einer Degeneration ab- oder zunimmt. Einige Autoren sprechen von einem erhöhten GAG-Gehalt bei Osteoarthritis, andere von einem verminderten GAG-Gehalt (ROUGHLEY u. LEE, 1994; DIJKGRAAF et al., 1995; SUN et al., 2012; BAUM et al., 2013). Ein verminderter Gehalt an GAG könnte im Rahmen entzündlicher Prozesse durch Aktivierung von Enzymen, wie

beispielsweise der Matrix-Metalloproteinasen und Aggrecanase, bedingt sein. Andererseits könnte es zu Beginn eines Degenerationsprozesses auch zu einem erhöhten GAG-Gehalt kommen, wenn die zuvor genannten Enzyme im Rahmen des Reparaturgeschehens zunächst gehemmt werden (KRUPKOVA et al., 2018; LÓPEZ-FRANCO u. GÓMEZ-BARRENA, 2018).

Interessant an unseren T1-Ergebnissen ist, dass die Werte mit intensiverer Proteoglycan-Färbung abnehmen und mit höherer Zellularität ansteigen. Dies könnte darauf hindeuten, dass die T1-Relaxationszeit das Potential aufweist zwischen degenerativen und regenerativen Prozessen zu unterscheiden. Die regenerativen Prozesse selbst durchlaufen auch verschiedene Phasen, welche differenziert betrachtet werden sollten. Nicht nur der Proteoglykangehalt verändert sich im Laufe der Degeneration, auch die Zellularität variiert im Verlauf. Zunächst ist die Zellularität erhöht, bevor es bei voranschreitender Schädigung dann zur Zellabnahme bis hin zu vermehrtem Zelltod kommt, der in azellulären Bereichen resultiert. Beschrieben ist auch, dass sich das Zellbild im Rahmen der Degeneration von Fibroblasten hin zu Chondrozyten verändert, was in einer höheren Produktion von Proteoglykanen als Anpassungs- bzw. Reparationsreaktion resultiert (PAULI et al., 2011; NEBELUNG et al., 2016). Derartig starke Veränderungen waren in unseren Menisken nicht zu finden, weshalb hier keine abschließende Aussage über die MRT-Werte getroffen werden kann. Auch andere Studien können dazu keine konkreten Aussagen treffen. Es gibt nach unserem Wissensstand aktuell nur erste Ergebnisse, die eine Korrelation zwischen T1 und dem Proteoglykangehalt zeigen. Diese gehen aber nicht auf die Veränderungen im Rahmen der Regeneration bzw. Degeneration ein (CASULA u. KAJABI, 2024).

Die mangelnde Signifikanz unserer Ergebnisse bezüglich der T2-, T2\*- und MTR-Werte könnte unter anderem an den nur sehr geringgradigen histologischen Veränderungen der Menisken liegen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen einiger Studien, die ebenfalls zu dem Schluss gekommen sind, dass die Sensitivität von T2, T2\* oder MTR eingeschränkt ist, wenn nur geringgradige Veränderungen der untersuchten Gewebe vorliegen (NEBELUNG et al., 2016; NEBELUNG et al., 2019; ZHANG et al., 2021). Die Autoren begründen dies damit, dass sich die Gewebeeigenschaften nur bei Menisken mit geringem und hohem Williamsscore deutlich genug unterscheiden, um sich in den MR-Parametern widerzuspiegeln. Bei chronischen leichten Veränderungen kommt es im Gegensatz zu akuten Verletzungen nur zu einem geringen Anstieg des Wassergehaltes im Extrazellularraum. Zusammen mit einer nahezu unveränderten Dichte und Ausrichtung der Kollagenfasern kann dies beispielsweise für die geringere Sensitivität von T2\* verantwortlich sein. Vor allem T2\* ist außerdem empfindlicher gegenüber Magnetfeldinhomogenitäten, was zu einer höheren Standardabweichung führen kann. Dies erschwert gerade in unserem Fall aufgrund geringer histologischer Unterschiede und einer eher kleinen Studienpopulation das Erzielen statistisch signifikanter Ergebnisse.

Auch die MTR ist relativ empfindlich gegenüber gewissen Störfaktoren, wie z.B. B1-Inhomogenitäten.

Eine klare Definition der MR-Parameter für gesunde und erkrankte Tiere und auch eine deutliche Korrelation zwischen MR-Parametern und histologischem Score konnten in anderen Studien vor allem bei höherem Osteoarthrose-Grad erzielt werden (ZARINS et al., 2010; WANG et al., 2016; NEBELUNG et al., 2016; WANG et al., 2016). Zarins et al. (2010) konnten beispielsweise zeigen, dass die T1 $\rho$ - und T2-Relaxationszeit im Knorpel bei Patienten mit Meniskusrissen vom Grad 2 bis 4 deutlich höher waren als bei Patienten mit Meniskusrissen Grad 0 bis 1 ( $p < 0.05$ ). Eine signifikante Unterscheidung zwischen den Gruppen mit Grad 0 und 1 gelang in dieser Studie nicht. Wie auch bei uns zeigt sich also, dass geringe histologische Unterschiede mittels dieser Relaxationszeiten nur schwer detektiert werden können. Wang et al. (2016) konnten signifikant verlängerte T1 $\rho$ - ( $p = 0.006$ ) und T2-Relaxationszeiten ( $p = 0.002$ ) im Meniskus bei Patienten mit einer Kreuzbandruptur finden. Diese Studie konnte auch bei Patienten ohne Meniskusriss eine deutliche Verlängerung der Relaxationszeiten im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen

Für weiterführende Untersuchungen hinsichtlich unserer Studie, wäre es also sicherlich sinnvoll, stärker an Osteoarthrose erkrankte Tiere zu untersuchen und diese anschließend mit einer gesunden Kontrollgruppe zu vergleichen. Als Kontrollgruppe wären in unserem Fall vor allem junge Hunde geeignet, die radiologisch keinen Hinweis auf eine Gonarthrose haben und deren Menisken in der histologischen Untersuchung frei von Degenerationen sind. Die Krankgruppe sollte ausschließlich Hunde einschließen, die radiologisch eine deutliche Gonarthrose aufweisen (mindestens Kellgren-Lawrence Grad 3). Da unsere Studien an Kadavern durchgeführt wurden, wäre bei gleichem Studiendesign bezüglich der Probengenerierung auch bei der Kontrollgruppe eine histologische Untersuchung der Menisken möglich. Dies ist in zahlreichen humanen Studien nicht möglich, kann aber eine wichtige Kontrolle der radiologisch vermuteten Gelenkgesundheit sein.

### 4.3. Schlussfolgerungen

Die MRT ist heute in der bildgebenden Diagnostik in der Kleintiermedizin nicht mehr wegzudenken. MRT-Geräte stehen jedoch meist nur in größeren tiermedizinischen Zentren zur Verfügung, da sowohl die Anschaffung als auch die Instandhaltung mit hohen Kosten verbunden sind. Meist finden sich Hochfeld-MRTs mit einer Feldstärke von 1,5 oder 3 Tesla. Einen Kompromiss bezüglich dieser Kosten stellen Geräte mit einer geringeren Feldstärke dar. Diese sind deutlich günstiger in Anschaffung und Wartung, weisen aber auch eine geringere Bildqualität auf. Vor allem im Bereich der Neurologie wird die MRT zur Diagnostik von Pathologien des Gehirns, des Rückenmarks oder der peripheren Nerven angewandt. Die Diagnostik von Erkrankungen des muskuloskeletalen Systems steht im veterinärmedizinischen Bereich noch nicht im Vordergrund. In der Humanmedizin wird sie dahingegen auch dort standardmäßig eingesetzt, z.B. für die Beurteilung von artikulären Strukturen des Kniegelenkes. Ein wichtiger Unterschied zwischen Human- und Tiermedizin ist sicherlich, dass für die MRT-Untersuchung bei Tieren in der Regel eine Vollnarkose notwendig ist. Diese ist unter anderem ein Grund dafür, dass dieses diagnostische Tool mit relativ hohen Kosten für die Tierbesitzer verbunden ist. Sowohl die Vollnarkose, als auch die Kosten stellen somit in der klinischen Anwendung unter Umständen eine Hürde für die Durchführung der MRT-Untersuchung dar.

Sowohl der Human- als auch der Veterinärmedizin gemein sind, die nahezu ausschließliche qualitative MR-Bildgebung im klinischen Alltag. Es werden also anhand verschiedener Kontraste subjektive Bewertungen bestimmter Strukturen vorgenommen. Dabei ist die Beurteilung der Bilddaten wenig objektiv, da sie unter anderem auch von der Erfahrung des untersuchenden Radiologen abhängig ist. Dabei sollte die Beurteilung der Bilddaten im Optimalfall von einem ausgebildeten Radiologen (Fachtierarzt oder Diplomate) erfolgen, um eine bestmögliche Interpretation der erhaltenen Befunde sicherzustellen.

Die strukturelle oder auch semi-quantitative Bildgebung kann optimalerweise zukünftig eine möglichst objektive Beurteilung der untersuchten Strukturen ermöglichen. Aktuell wird diese Art der Bildgebung noch wenig bei klinischen Fragestellungen eingesetzt. Dies liegt sicherlich an der Komplexität der Bildaufnahmen und Dateninterpretation und den teils deutlich längeren Aquisitionszeiten (TOFTS, 2003a; BERG et al., 2022). Eine „normale“ qualitative MRT-Untersuchung ist z.B. im Vergleich zu einer Untersuchung mittels Computertomographie deutlich zeitaufweniger. Die Aufnahme spezieller Parameter für die semi-quantitative Beurteilung ist aufgrund noch längerer Aquisitionszeiten daher schwierig im klinischen Alltag umzusetzen, gerade auch bezogen auf die Narkosedauer für den Patienten.

Nichtsdestotrotz birgt diese Art der MR-Bildgebung ein riesiges Potential für die frühzeitige Erkennung von mikrostrukturellen Gewebeveränderungen, dem in Zukunft Beachtung

geschenkt werden sollte. Im Bereich der Forschung können beispielsweise Gewebeveränderungen vor und nach Behandlungen bzw. die Auswirkungen verschiedenster Therapien auf die Gewebestruktur untersucht werden. Auch in der klinischen Anwendung kann die semiquantitative Bildgebung detailliertere Informationen über die untersuchten Strukturen geben und somit im Bereich der Frühdiagnostik eingesetzt werden. Dies gilt nicht nur für die Veterinärmedizin, sondern vor allem auch für die Humanmedizin. Gerade im Rahmen der Osteoarthritis kann eine frühzeitige Diagnose die Behandlungschancen erheblich verbessern. Auch in Bezug auf anderen Erkrankungen, wie beispielsweise ein vorder Kreuzbandriss, kann eine derartige MRT-Untersuchung hilfreich sein. Es könnten z.B. schon Patienten mit einem Risiko erkannt werden, wenn bereits eine veränderte Mikrostruktur der Kreuzbänder detektiert werden könnte. Die hier durchgeführten Untersuchungen der Menisken sind also vorerst nur beispielhaft und sollten sicherlich ergänzt werden. Durch weitere Untersuchungen und die Integration von Referenzwerten für verschiedene artikuläre Strukturen von Hunden kann sowohl das Verständnis der Pathogenese der Osteoarthritis, als auch deren Diagnostik und Therapie maßgeblich verbessert werden. Dies kann zu wichtigen Erkenntnissen führen, von denen die hündischen Patienten langfristig z.B. durch verbesserte konservative Therapien profitieren können. Weitere Untersuchungen könnten jedoch auch als Modell für die Humanmedizin dienen und somit auch in diesem Bereich von großem Interesse bzw. Nutzen sein.

## 5. Zusammenfassung

Die Osteoarthrose des Kniegelenkes ist sowohl beim Menschen, als auch beim Hund, unabhängig von der genauen Genese, ein weit verbreitetes Erkrankungsbild. Sie kann je nach Schweregrad zu deutlichen Einschränkungen in der Lebensqualität betroffener Patienten führen. Eine Heilung bzw. das Verhindern des Voranschreitens der Degenerationen ist nach aktuellem Stand nicht möglich. Behoben werden können im Bereich der Tiermedizin mehr oder weniger die auslösenden Faktoren, wie beispielsweise ein vorderer Kreuzbandriss oder eine Patellaluxation beim Hund. Das Auftreten einer Osteoarthrose nach einer solchen Gelenkerkrankung zu verhindern, ist jedoch nicht möglich. Aktuelle Therapien können im besten Fall Symptome lindern und das Voranschreiten der Erkrankung verlangsamen. Die Menisken des Kniegelenkes spielen als mandarinenförmige Faserknorpelscheiben eine äußerst wichtige Rolle zur Gesunderhaltung des Gelenkes. Sie gleichen die Inkongruenz zwischen den Gelenkflächen des Femurs und der Tibia aus und minimieren Stoß- und Druckbelastungen. Aufgrund dieser anspruchsvollen mechanischen Funktion sind die Menisken häufig von Degenerationen betroffen. Meniskusschäden entstehen beispielsweise häufig im Zusammenhang mit einer Kreuzbandruptur und sie können das Entstehen bzw. das Ausmaß der Osteoarthrose stark beeinflussen. Daher kommt ihnen im Rahmen wissenschaftlicher Studien zur Pathogenese und Therapie der Arthrose eine wichtige Bedeutung zu.

Zur Abklärung von Meniskusschäden ist die MRT v.a. in der Humanmedizin das Mittel der ersten Wahl. Als nicht invasive Technik ermöglicht sie eine sehr gute Darstellung der Menisken. Die konventionelle qualitative MR-Bildgebung weist jedoch Defizite auf, wenn es um die Darstellung mikrostruktureller Veränderungen der Menisken geht. Sie kann nur Pathologien detektieren, die zu morphologischen Veränderungen des Gewebes führen. Da aber gerade im Rahmen der Arthroseentstehung eine frühzeitige Erkennung die besten Aussichten auf eine erfolgreiche Therapie hat, kommen zunehmend MR-Sequenzen zum Einsatz, die (mikro-)strukturelle Veränderungen des Gewebes detektieren können. Auch für andere Anwendungsgebiete, wie z.B. die Überprüfung von verschiedenen therapeutischen Maßnahmen, kann diese Art der Bildgebung sinnvoll sein.

Das Ziel dieser Studie war es, die T1-, T2-, T2\*-Relaxationszeit und den Magnetisierungsansfer in Form der MTR und des MTsat als Biomarker für frühe Meniskusdegenerationen zu untersuchen. Dazu wurden in einem *ex vivo* Studiendesign die Menisken älterer Hunde mittels verschiedener MR-Kontraste untersucht. Im Anschluss erfolgte die histologische Untersuchung der Menisken zur Beurteilung von Zellularität, Kollagenorganisation, Kollagen-gehalt und Proteoglykangehalt.

In der ersten Studie zur Untersuchung der T2-Relaxationszeit wurden 16 Gelenk von 8 mittelgroßen, älteren Hunden untersucht. Durchgeführt wurden die MRT-Untersuchung der Kniegelenke mit manueller Segmentierung der Menisken und deren anschließender histologischer Untersuchung. Die T2-Relaxationszeit lag im Mittel bei 18,3ms. Die medialen Menisken wiesen im Mittel eine T2-Relaxationszeit von 17,7ms auf, die lateralen Menisken eine T2-Relaxationszeit von 19,0ms. Wir konnten keinen signifikanten Unterschied zwischen den medialen und lateralen Menisken feststellen. Außerdem fand sich keine Korrelation zwischen T2-Relaxation und Alter und Geschlecht der untersuchten Hunde. In der histologischen Untersuchung fanden wir einen signifikant höheren Degenerationsgrad in den medialen Menisken (Score 4,75 (medial) vs. 3,75 (lateral)).

Zwischen den histologischen Ergebnissen und der T2-Relaxations der Menisken konnte keine signifikante Korrelation festgestellt werden.

In der zweiten Studie musste aufgrund technischer Fehler ein Gelenk von der Auswertung ausgeschlossen werden. Es wurden somit insgesamt 30 Menisken von 15 Gelenken untersucht. Die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen wurden von der vorangegangenen Studie übernommen und um einige bildgebenden Parameter (T1, T2\*, Magnetisierungstransfer) ergänzt.

Auch hier konnten nur vereinzelt Zusammenhänge zwischen histologischen und bildgebenden Parametern gefunden werden. Die T1-Relaxation sank mit steigendem Proteoglykangehalt und stieg mit zunehmender Zellularität an. Die mittlere T1-Relaxation der medialen Menisken lag bei 517ms, die der lateralen Menisken bei 536ms.

Die MTsat-Werte waren dahingegen in Menisken mit höherem Proteoglykanscore erhöht. Der Mittelwert von MTsat lag für die medialen Menisken bei 0,08ms und für die lateralen Menisken bei 0,08ms. Der Proteoglykan- und Kollagengehalt zeigten in unseren Ergebnissen einen gegensätzlichen Effekt auf MTsat zu haben. Um dies weitergehend betrachten zu können, wurde zusätzlich das Verhältnis von Kollagen- und Proteoglykanscore gebildet. Dabei zeigte sich, dass MTsat bei höherem „Kollagen-zu-Proteoglykan-Verhältnis“ signifikant niedriger war ( $p < 0,002$ ).

Eine Korrelation zwischen dem histologischen Gesamtscore und den einzelnen MR-Parametern konnte auch hier nicht gefunden werden. Bei unabhängiger Analyse der medialen und lateralen Menisken konnte eine leichte negative Korrelation zwischen MTR und dem Histoscore der medialen Menisken gefunden werden. Diese Korrelation ist jedoch nur als Tendenz anzusprechen, da sie keine statistische Signifikanz erreichte ( $p = 0,08$ ). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass MTR tendenziell niedriger in den medialen Menisken war ( $p = 0,059$ ). Die histologische Untersuchung der Menisken ergab einen signifikant höheren

Proteoglykanscore der medialen Menisken bei zugleich größerer Variabilität innerhalb der einzelnen Proben ( $p=0,006$ ). Daraus könnte geschlossen werden, dass MTR indirekt mit dem Proteoglykanscore in Zusammenhang steht.

Die Ergebnisse dieser Studien zeigen, dass grundsätzlich geringe histologische Veränderungen in den Menisken älterer, klinisch unauffälliger Hunde nachweisbar sind. Keiner der untersuchten MR-Kontraste wies eine hohe Spezifität oder Sensitivität bezüglich geringgradiger histologischer Meniskusveränderungen auf. Die gezeigten Zusammenhänge von MTsat und T1-Relaxationszeit mit dem Proteoglykangehalt bzw. der Zellularität sprechen dafür, dass einige dieser Parameter vielversprechende Kandidaten sein könnten, um mikrostrukturelle Gewebeveränderungen zu detektieren. Gleichzeitig zeigen die Studien aber auch, dass die Darstellung von geringgradigen Meniskusdegenerationen sehr herausfordernd ist.

Die semi-quantitative Bildgebung muss v.a. im Bereich der Tiermedizin erst noch etabliert werden. Sie bietet jedoch grundsätzlich ein hohes Potential für die Früherkennung von strukturellen Meniskusveränderungen und kann somit sowohl in der Forschung als auch in der klinischen Anwendung wertvolle Informationen liefern.

## 6. Summary

Osteoarthritis of the knee joint is a common disease in humans and dogs. Depending on its severity, it can lead to significant limitations in the quality of life of affected patients. According to current knowledge, it is not possible to cure or prevent the progression of degeneration. In veterinary medicine, the causing factors, such as a torn anterior cruciate ligament or patellar luxation in dogs, can be more or less treated. However, it is not possible to prevent the occurrence of osteoarthritis after different joint diseases. Current therapies are able to improve clinical symptoms and slow down the progression of the disease. The menisci of the knee joint, which are mandarin-shaped discs of fibrous cartilage, play an extremely important role in keeping the joint healthy. They compensate for the incongruity between the joint surfaces of the femur and tibia and minimize shock and pressure loads. Due to this demanding mechanical function, the menisci are often affected by degeneration. Meniscus damage often occurs for example in case of cruciate ligament rupture and can have a bad influence on the development or extent of osteoarthritis. They are therefore of great importance in scientific studies to improve the understanding of the pathogenesis and treatment of osteoarthritis.

MRI is actually the golden standard for diagnosing meniscus damage, especially in human medicine. As a non-invasive technique, it provides excellent imaging of the menisci. However, conventional qualitative MR imaging has limitations when it comes to imaging microstructural changes in the menisci. It can only detect pathologies that lead to morphological changes in the tissue. In order to better recognize changes at an early stage, MR sequences that can detect (micro)structural changes in the tissue are increasingly being used. This type of imaging can also be useful for other applications, such as the evaluation of various therapeutic measures.

The aim of this study was to investigate T1, T2, T2\* relaxation time, and magnetization transfer as MTR and MTsat as biomarkers for early meniscus degeneration. So we examined the menisci of older dogs using various MR contrasts in an ex vivo study design. MR imaging was followed by histological examination of the menisci to assess cellularity, collagen organization, collagen content, and proteoglycan content.

In the first study investigating T2 relaxation time, 16 joints from 8 medium-sized older dogs were examined. MRI examinations of the knee joints were performed with manual segmentation of the menisci and subsequent histological examination. The mean T2 relaxation time was 18.3 ms. The medial menisci had a mean T2 relaxation time of 17.7 ms, while the lateral menisci had a mean T2 relaxation time of 19.0 ms. We couldn't find any significant difference between the medial and lateral menisci. Furthermore, no correlation was found between T2 relaxation and the age and sex of the examined dogs. In the histological examination, we found a significantly higher degree of degeneration in the medial menisci

(score 4.75) compared to lateral menisci (score 3.75). No significant correlation could be found between the histological results and the T2 relaxation of the menisci.

In the second study, one joint had to be excluded from the evaluation due to technical errors. A total of 30 menisci from 15 joints were examined. The results of the histological examination were taken from the previous study and supplemented with several imaging parameters (T1, T2\*, magnetization transfer).

The results indicated, that T1 relaxation decreased with increasing proteoglycan content and increased with increasing cellularity. The mean T1 relaxation of the medial menisci was 517 ms, and that of the lateral menisci was 536 ms.

In contrast, MTsat values were elevated in menisci with higher proteoglycan scores. The mean MTsat value was 0.08 ms for the medial menisci and 0.08 ms for the lateral menisci. Our results showed that proteoglycan and collagen content had opposite effects on MTsat. To examine this further, we also calculated the ratio of collagen to proteoglycan scores. This results showed that MTsat was significantly lower when the collagen-to-proteoglycan ratio was higher ( $p < 0.002$ ).

No correlation could be found between the overall histological score and the individual MR parameters. Independent analysis of the medial and lateral menisci revealed a slight negative correlation between MTR and the histological score of the medial menisci. However, this correlation can only be described as a trend, as it did not reach statistical significance ( $p = 0.08$ ). Furthermore, it was shown that MTR tended to be lower in the medial menisci ( $p = 0.059$ ). Histological examination of the menisci revealed a significantly higher proteoglycan score in the medial menisci, with greater variability within the individual samples ( $p = 0.006$ ). It may be concluded that MTR is indirectly related to the proteoglycan score.

The results of our studies show that minor histological changes are present in the menisci of elderly, lameless dogs. None of the examined MR contrasts showed high specificity or sensitivity with regard to minor histological changes in the menisci. The correlations shown between MTsat and T1 relaxation time with proteoglycan content and cellularity suggest that some of these parameters could be promising candidates for detecting microstructural tissue changes. Overall, the studie results also show that the visualization of minor meniscus degeneration with semi-quantitative MR imaging is very challenging.

Semi-quantitative imaging is not established yet, especially in the field of veterinary medicine. However, it offers great potential for the early detection of structural meniscus changes and can therefore provide valuable information in both research and clinical applications.

## 7. Literatur

- ABRAHAM, A.C., EDWARDS, C.R., ODEGARD, G.M., DONAHUE, T.L.H. (2011): Regional and fiber orientation dependent shear properties and anisotropy of bovine meniscus. *J Mech Behav Biomed Mater* **4**, 2024–2030. doi:10.1016/j.jmbbm.2011.06.022.
- AFSAHI, A.M., MA, Y., JANG, H., JERBAN, S., CHUNG, C.B., CHANG, E.Y., DU, J. (2022): Ultrashort Echo Time Magnetic Resonance Imaging Techniques. *J Magn Reson Imaging* **55**, 1597–1612. doi:10.1002/jmri.28032.
- AIDOS, L., MODINA, S.C., MILLAR, V.R.H., PERETTI, G.M., MANGIAVINI, L., FERRONI, M., BOSCHETTI, F., DI GIANCAMILLO, A. (2022): Meniscus Matrix Structural and Biomechanical Evaluation. *Bioengineering (Basel)* **9**. doi:10.3390/bioengineering9030117.
- ANTONY, B., DRIBAN, J.B., PRICE, L.L., LO, G.H., WARD, R.J., NEVITT, M., LYNCH, J., EATON, C.B., DING, C., MCALINDON, T.E. (2017): The relationship between meniscal pathology and osteoarthritis depends on the type of meniscal damage visible on magnetic resonance images. *Osteoarthritis Cartilage* **25**, 76–84. doi:10.1016/j.joca.2016.08.004.
- ARNO, S., BELL, C.P., XIA, D., REGATTE, R.R., KRASNOKUTSKY, S., SAMUELS, J., OH, C., ABRAMSON, S., WALKER, P.S. (2016): Relationship between meniscal integrity and risk factors for cartilage degeneration. *Knee* **23**, 686–691. doi:10.1016/j.knee.2015.11.004.
- AUFDERHEIDE, A.C., ATHANASIOU, K.A. (2004): Mechanical stimulation toward tissue engineering of the knee meniscus. *Ann Biomed Eng* **32**, 1161–1174. doi:10.1114/b:abme.0000036652.31658.f3.
- BANJAR, M., HORIUCHI, S., GEDEON, D.N., YOSHIOKA, H. (2022): Review of Quantitative Knee Articular Cartilage MR Imaging. *Magn Reson Med Sci* **21**, 29–40. doi:10.2463/mrms.rev.2021-0052.
- BAUM, T., JOSEPH, G.B., KARAMPINOS, D.C., JUNGSMANN, P.M., LINK, T.M., BAUER, J.S. (2013): Cartilage and meniscal T2 relaxation time as non-invasive biomarker for knee osteoarthritis and cartilage repair procedures. *Osteoarthritis Cartilage* **21**, 1474–1484. doi:10.1016/j.joca.2013.07.012.
- BERG, R.C., LEUTRITZ, T., WEISKOPF, N., PREIBISCH, C. (2022): Multi-parameter quantitative mapping of R1, R2\*, PD, and MTsat is reproducible when accelerated with Compressed SENSE. *Neuroimage* **253**, 119092. doi:10.1016/j.neuroimage.2022.119092.
- BIEDERER, J. (2005): Magnetresonanztomographie-technische Grundlagen und aktuelle Entwicklungen. *Med Klin (Munich)* **100**, 62–72. doi:10.1007/s00063-005-1124-z.
- BRANDT, K.D., RADIN, E.L., DIEPPE, P.A., VAN DE PUTTE, L. (2006): Yet more evidence that osteoarthritis is not a cartilage disease. *Ann Rheum Dis* **65**, 1261–1264. doi:10.1136/ard.2006.058347.

- BRÜHSCHWEIN, A., KÖSTLIN, R., MATIS, U. (2018): Magnetresonanztomographie in der Kleintiermedizin. *Tierarztl Prax Ausg K* **34**, 139–146. doi:10.1055/s-0037-1622524.
- BUNZENDAHL, L., MOUSSAVI, A., BLEYER, M., DEHNERT, J., BORETIUS, S., NEUMANN, S. (2023): Histological Findings and T2 Relaxation Time in Canine Menisci of Elderly Dogs-An Ex Vivo Study in Stifle Joints. *Vet Sci* **10**. doi:10.3390/vetsci10030182.
- CASULA, V., KAJABI, A.W. (2024): Quantitative MRI methods for the assessment of structure, composition, and function of musculoskeletal tissues in basic research and preclinical applications. *MAGMA* **37**, 949–967. doi:10.1007/s10334-024-01174-7.
- CHAN, K.-S., HÉDOUIN, R., MOLLINK, J., SCHULZ, J., VAN CAPPELLEN WALSUM, A.-M., MARQUES, J.P. (2022): Imaging white matter microstructure with gradient-echo phase imaging. *Magn Reson Med* **88**, 380–390. doi:10.1002/mrm.29213.
- CHU, C.R., WILLIAMS, A.A., COYLE, C.H., BOWERS, M.E. (2012): Early diagnosis to enable early treatment of pre-osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* **14**, 212. doi:10.1186/ar3845.
- COOK, J.L., SMITH, P.A., BOZYNSKI, C.C., KUROKI, K., COOK, C.R., STOKER, A.M., PFEIFFER, F.M. (2016): Multiple injections of leukoreduced platelet rich plasma reduce pain and functional impairment in a canine model of ACL and meniscal deficiency. *J Orthop Res* **34**, 607–615. doi:10.1002/jor.23054.
- DIEKMANN, H.U. (2018): Analysis of the pathogenesis and progression of osteoarthritis in canine stifle joints considering three bone healing markers.
- DIJKGRAAF, L.C., BONT, L.G. DE, BOERING, G., LIEM, R.S. (1995): Normal cartilage structure, biochemistry, and metabolism. *J Oral Maxillofac Surg* **53**, 924–929. doi:10.1016/0278-2391(95)90283-x.
- DONECKER, J., LATTIMER, J.C., GASCHEN, L., AULAKH, K.S. (2021): Safety and Clinical Response Following a Repeat Intraarticular Injection of Tin-117m (117mSn) Colloid in Dogs with Elbow Osteoarthritis. *Vet Med (Auckl)* **12**, 325–335. doi:10.2147/VMRR.S345144.
- DUSEK, P., MADAI, V.I., HUELNHAGEN, T., BAHN, E., MATEJ, R., SOBESKY, J., NIENDORF, T., ACOSTA-CABRONERO, J., WUERFEL, J. (2019): The choice of embedding media affects image quality, tissue R2\* , and susceptibility behaviors in post-mortem brain MR microscopy at 7.0T. *Magn Reson Med* **81**, 2688–2701. doi:10.1002/mrm.27595.
- EBATA, K., NORIKI, S., INAI, K., KIMURA, H. (2021): Changes in magnetic resonance imaging relaxation time on postmortem magnetic resonance imaging of formalin-fixed human normal heart tissue. *BMC Med Imaging* **21**, 134. doi:10.1186/s12880-021-00666-5.
- EIJGENRAAM, S.M., BOVENDEERT, F.A.T., VERSCHUEREN, J., VAN TIEL, J., BASTIAANSEN-JENNISKENS, Y.M., WESDORP, M.A., NASSERINEJAD, K.,

- MEUFFELS, D.E., GUENOUN, J., KLEIN, S., REIJMAN, M., OEI, E.H.G. (2019): T2 mapping of the meniscus is a biomarker for early osteoarthritis. *Eur Radiol* **29**, 5664–5672. doi:10.1007/s00330-019-06091-1.
- FLO, G.L. (1993): Meniscal injuries. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **23**, 831–843. doi:10.1016/s0195-5616(93)50085-2.
- FOX, A.J.S., WANIVENHAUS, F., BURGE, A.J., WARREN, R.F., RODEO, S.A. (2015): The human meniscus. *Clin Anat* **28**, 269–287. doi:10.1002/ca.22456.
- GAVIN, P.R. (2011): Growth of clinical veterinary magnetic resonance imaging. *Vet Radiol Ultrasound* **52**, S2-4. doi:10.1111/j.1740-8261.2010.01779.x.
- GRABHER, P., CALLAGHAN, M.F., ASHBURNER, J., WEISKOPF, N., THOMPSON, A.J., CURT, A., FREUND, P. (2015): Tracking sensory system atrophy and outcome prediction in spinal cord injury. *Ann Neurol* **78**, 751–761. doi:10.1002/ana.24508.
- GRAY, M.L., BURSTEIN, D., LESPERANCE, L.M., GEHRKE, L. (1995): Magnetization transfer in cartilage and its constituent macromolecules. *Magn Reson Med* **34**, 319–325. doi:10.1002/mrm.1910340307.
- HARPER, T.A.M., JONES, J.C., SAUNDERS, G.K., DANIEL, G.B., LEROITH, T., ROSSMEISSL, E. (2011): Sensitivity of low-field T2 images for detecting the presence and severity of histopathologic meniscal lesions in dogs. *Vet Radiol Ultrasound* **52**, 428–435. doi:10.1111/j.1740-8261.2011.01818.x.
- HELMS, G., DATHE, H., KALLENBERG, K., DECHENT, P. (2008): High-resolution maps of magnetization transfer with inherent correction for RF inhomogeneity and T1 relaxation obtained from 3D FLASH MRI. *Magn Reson Med* **60**, 1396–1407. doi:10.1002/mrm.21732.
- HENKELMAN, R.M., STANISZ, G.J., GRAHAM, S.J. (2001): Magnetization transfer in MRI. *NMR Biomed* **14**, 57–64. doi:10.1002/nbm.683.
- HOFMANN, F.C., NEUMANN, J., HEILMEIER, U., JOSEPH, G.B., NEVITT, M.C., MCCULLOCH, C.E., LINK, T.M. (2018): Conservatively treated knee injury is associated with knee cartilage matrix degeneration measured with MRI-based T2 relaxation times. *Skeletal Radiol* **47**, 93–106. doi:10.1007/s00256-017-2759-6.
- HONTOIR, F., CLEGG, P., NISOLLE, J.-F., TEW, S., VANDEWEERD, J.-M. (2015): Magnetic resonance compositional imaging of articular cartilage. *Vet J* **205**, 11–20. doi:10.1016/j.tvjl.2015.04.035.
- HONTOIR, F., PIRSON, R., SIMON, V., CLEGG, P., NISOLLE, J.-F., KIRSCHVINK, N., VANDEWEERD, J.-M.E. (2019): Age-related morphometric changes of the tidemark in the ovine stifle. *Anat Histol Embryol* **48**, 366–374. doi:10.1111/ahe.12449.

- HU, J., XIN, H., CHEN, Z., ZHANG, Q., PENG, Y., JIN, Z. (2019): The role of menisci in knee contact mechanics and secondary kinematics during human walking. *Clin Biomech* (Bristol, Avon) **61**, 58–63. doi:10.1016/j.clinbiomech.2018.11.009.
- INNES, J.F., COSTELLO, M., BARR, F.J., RUDORF, H., BARR, A.R.S. (2004): Radiographic progression of osteoarthritis of the canine stifle joint. *Vet Radiol Ultrasound* **45**, 143–148. doi:10.1111/j.1740-8261.2004.04024.x.
- KELLGREN, J.H., LAWRENCE, J.S. (1957): Radiological assessment of osteo-arthritis. *Ann Rheum Dis* **16**, 494–502. doi:10.1136/ard.16.4.494.
- KIM, T., MIN, B.-H., YOON, S.-H., KIM, H., PARK, S., LEE, H.Y., KWACK, K.-S. (2014): An in vitro comparative study of T2 and T2\* mappings of human articular cartilage at 3-Tesla MRI using histology as the standard of reference. *Skeletal Radiol* **43**, 947–954. doi:10.1007/s00256-014-1872-z.
- KOFF, M.F., SHAH, P., POWNDER, S., ROMERO, B., WILLIAMS, R., GILBERT, S., MAHER, S., FORTIER, L.A., RODEO, S.A., POTTER, H.G. (2013): Correlation of meniscal T2\* with multiphoton microscopy, and change of articular cartilage T2 in an ovine model of meniscal repair. *Osteoarthritis Cartilage* **21**, 1083–1091. doi:10.1016/j.joca.2013.04.020.
- KRUPKOVA, O., SMOLDERS, L., WUERTZ-KOZAK, K., COOK, J., POZZI, A. (2018): The Pathobiology of the Meniscus. *Front Vet Sci* **5**, 73. doi:10.3389/fvets.2018.00073.
- LABRUYÈRE, J., SCHWARZ, T. (2013): CT and MRI in veterinary patients. *In Practice* **35**, 546–563. doi:10.1136/inp.f6720.
- LEE, W., MILLER, E.Y., ZHU, H., LUETKEMEYER, C.M., SCHNEIDER, S.E., NEU, C.P. (2023): High frame rate deformation analysis of knee cartilage by spiral dualMRI and relaxation mapping. *Magn Reson Med* **89**, 694–709. doi:10.1002/mrm.29487.
- LEMA, A., BISHOP, C., MALIK, O., MATTOSCIIO, M., ALI, R., NICHOLAS, R., MURARO, P.A., MATTHEWS, P.M., WALDMAN, A.D., NEWBOULD, R.D. (2017): A Comparison of Magnetization Transfer Methods to Assess Brain and Cervical Cord Microstructure in Multiple Sclerosis. *J Neuroimaging* **27**, 221–226. doi:10.1111/jon.12377.
- LEUTRITZ, T., SEIF, M., HELMS, G., SAMSON, R.S., CURT, A., FREUND, P., WEISKOPF, N. (2020a): Multiparameter mapping of relaxation (R1, R2\*), proton density and magnetization transfer saturation at 3 T. *Hum Brain Mapp* **41**, 4232–4247. doi:10.1002/hbm.25122.
- LEUTRITZ, T., SEIF, M., HELMS, G., SAMSON, R.S., CURT, A., FREUND, P., WEISKOPF, N. (2020b): Multiparameter mapping of relaxation (R1, R2\*), proton density and magnetization transfer saturation at 3 T. *Hum Brain Mapp* **41**, 4232–4247. doi:10.1002/hbm.25122.

- LI, W., HONG, L., HU, L., MAGIN, R.L. (2010): Magnetization transfer imaging provides a quantitative measure of chondrogenic differentiation and tissue development. *Tissue Eng Part C Methods* **16**, 1407–1415. doi:10.1089/ten.tec.2009.0777.
- LI, X., HAN, E.T., MA, C.B., LINK, T.M., NEWITT, D.C., MAJUMDAR, S. (2005): In vivo 3T spiral imaging based multi-slice T(1rho) mapping of knee cartilage in osteoarthritis. *Magn Reson Med* **54**, 929–936. doi:10.1002/mrm.20609.
- LISS, C., LÜSSE, S., KARGER, N., HELLER, M., GLÜER, C.-C. (2002): Detection of changes in cartilage water content using MRI T2-mapping in vivo. *Osteoarthritis Cartilage* **10**, 907–913. doi:10.1053/joca.2002.0847.
- LÓPEZ-FRANCO, M., GÓMEZ-BARRENA, E. (2018): Cellular and molecular meniscal changes in the degenerative knee. *J Exp Orthop* **5**, 11. doi:10.1186/s40634-018-0126-8.
- MACFARLANE, L.A., YANG, H., COLLINS, J.E., GUERMAZI, A., JONES, M.H., TEEPLE, E., XU, L., LOSINA, E., KATZ, J.N. (2017): Associations among meniscal damage, meniscal symptoms and knee pain severity. *Osteoarthritis Cartilage* **25**, 850–857. doi:10.1016/j.joca.2016.12.023.
- MAMISCH, T.C., HUGHES, T., MOSHER, T.J., MUELLER, C., TRATTNIG, S., BOESCH, C., WELSCH, G.H. (2012): T2 star relaxation times for assessment of articular cartilage at 3 T. *Skeletal Radiol* **41**, 287–292. doi:10.1007/s00256-011-1171-x.
- MCDERMOTT, I. (2011): Meniscal tears, repairs and replacement. *Br J Sports Med* **45**, 292–297. doi:10.1136/bjism.2010.081257.
- MCDEVITT, C.A., WEBBER, R.J. (1990): The ultrastructure and biochemistry of meniscal cartilage. *Clin Orthop Relat Res*, 8–18.
- MEHTA, R.C., PIKE, G.B., ENZMANN, D.R. (1995): Improved detection of enhancing and nonenhancing lesions of multiple sclerosis with magnetization transfer. *AJNR Am J Neuroradiol* **16**, 1771–1778.
- MITTAL, S., PRADHAN, G., SINGH, S., BATRA, R. (2019): T1 and T2 mapping of articular cartilage and menisci in early osteoarthritis of the knee using 3-Tesla magnetic resonance imaging. *Pol J Radiol* **84**, e549-e564. doi:10.5114/pjr.2019.91375.
- MOSHER, T.J., DARDZINSKI, B.J. (2004): Cartilage MRI T2 relaxation time mapping. *Semin Musculoskelet Radiol* **8**, 355–368. doi:10.1055/s-2004-861764.
- MOSHER, T.J., LIU, Y., TOROK, C.M. (2010): Functional cartilage MRI T2 mapping. *Osteoarthritis Cartilage* **18**, 358–364. doi:10.1016/j.joca.2009.11.011.
- NEBELUNG, S., POST, M., KNOBE, M., TINGART, M., EMANS, P., THÜRING, J., KUHL, C., TRUHN, D. (2019): Detection of Early-Stage Degeneration in Human Articular Cartilage by Multiparametric MR Imaging Mapping of Tissue Functionality. *Sci Rep* **9**, 5895. doi:10.1038/s41598-019-42543-w.

- NEBELUNG, S., TINGART, M., PUFE, T., KUHL, C., JAHR, H., TRUHN, D. (2016): Ex vivo quantitative multiparametric MRI mapping of human meniscus degeneration. *Skeletal Radiol* **45**, 1649–1660. doi:10.1007/s00256-016-2480-x.
- NOESKE, R. (2000): Anwendung der Hochfeld-(3-Tesla)-NMR-Tomographie, Freie Universität Berlin. doi:10.17169/REFUBIUM-10130.
- ODÉEN, H., PARKER, D.L. (2019): Magnetic resonance thermometry and its biological applications - Physical principles and practical considerations. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* **110**, 34–61. doi:10.1016/j.pnmrs.2019.01.003.
- OLSSON, H., ANDERSEN, M., WIRESTAM, R., HELMS, G. (2021): Mapping magnetization transfer saturation (MTsat) in human brain at 7T. *Magn Reson Med* **86**, 2562–2576. doi:10.1002/mrm.28899.
- PAULI, C., GROGAN, S.P., PATIL, S., OTSUKI, S., HASEGAWA, A., KOZIOL, J., LOTZ, M.K., D'LIMA, D.D. (2011): Macroscopic and histopathologic analysis of human knee menisci in aging and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **19**, 1132–1141. doi:10.1016/j.joca.2011.05.008.
- POWNDER, S., HAYASHI, K., CASERTO, B., BREIGHNER, R., NORMAN, M., POTTER, H., KOFF, M., POWNDER, S.L., CASERTO, B.G., BREIGHNER, R.E., NORMAN, M.L., POTTER, H.G., KOFF, M.F. (2018): Quantitative Magnetic Resonance Imaging and Histological Comparison of Normal Canine Menisci. *Vet Comp Orthop Traumatol* **31**, 452–457. doi:10.1055/s-0038-1668115.
- POWNDER, S.L., HAYASHI, K., CASERTO, B.G., NORMAN, M.L., POTTER, H.G., KOFF, M.F. (2018): Magnetic Resonance Imaging T2 Values of Stifle Articular Cartilage in Normal Beagles. *Vet Comp Orthop Traumatol* **31**, 108–113. doi:10.3415/VCOT-17-03-0093.
- PYE, C., BRUNIGES, N., PEFFERS, M., COMERFORD, E. (2022): Advances in the pharmaceutical treatment options for canine osteoarthritis. *J Small Anim Pract* **63**, 721–738. doi:10.1111/jsap.13495.
- RAUSCHER, I., STAHL, R., CHENG, J., LI, X., HUBER, M.B., LUKE, A., MAJUMDAR, S., LINK, T.M. (2008): Meniscal measurements of T1rho and T2 at MR imaging in healthy subjects and patients with osteoarthritis. *Radiology* **249**, 591–600. doi:10.1148/radiol.2492071870.
- REGATTE, R.R., AKELLA, S.V.S., WHEATON, A.J., LECH, G., BORTHAKUR, A., KNEELAND, J.B., REDDY, R. (2004): 3D-T1rho-relaxation mapping of articular cartilage. *Acad Radiol* **11**, 741–749. doi:10.1016/j.acra.2004.03.051.
- ROPELE, S., FAZEKAS, F. (2009): Magnetization transfer MR imaging in multiple sclerosis. *Neuroimaging Clin N Am* **19**, 27–36. doi:10.1016/j.nic.2008.09.004.

- ROUGHLEY, P.J., LEE, E.R. (1994): Cartilage proteoglycans. *Microsc Res Tech* **28**, 385–397. doi:10.1002/jemt.1070280505.
- SHARUN, K., JAMBAGI, K., DHAMA, K., KUMAR, R., PAWDE, A.M., Amarpal (2021): Therapeutic Potential of Platelet-Rich Plasma in Canine Medicine. *Arch Razi Inst* **76**, 721–730. doi:10.22092/ari.2021.355953.1749.
- SON, M., GOODMAN, S.B., CHEN, W., HARGREAVES, B.A., GOLD, G.E., LEVENSTON, M.E. (2013): Regional variation in T1 $\rho$  and T2 times in osteoarthritic human menisci. *Osteoarthritis Cartilage* **21**, 796–805. doi:10.1016/j.joca.2013.03.002.
- SUN, Y., MAUERHAN, D.R., KNEISL, J.S., JAMES NORTON, H., ZINCHENKO, N., INGRAM, J., HANLEY, E.N., GRUBER, H.E. (2012): Histological examination of collagen and proteoglycan changes in osteoarthritic menisci. *Open Rheumatol J* **6**, 24–32. doi:10.2174/1874312901206010024.
- TOFTS, P. (2003a): Quantitative MRI of the Brain. doi:10.1002/0470869526.
- TOFTS, P. (2003b): Quantitative MRI of the Brain: Measuring Changes Caused by Disease. doi:10.1002/0470869526.
- TOGAO, O., HIWATASHI, A., WADA, T., YAMASHITA, K., KIKUCHI, K., TOKUNAGA, C., KEUPP, J., YONEYAMA, M., HONDA, H. (2018): A Qualitative and Quantitative Correlation Study of Lumbar Intervertebral Disc Degeneration Using Glycosaminoglycan Chemical Exchange Saturation Transfer, Pfirrmann Grade, and T1- $\rho$ . *AJNR Am J Neuroradiol* **39**, 1369–1375. doi:10.3174/ajnr.A5657.
- VAN TIEL, J., KOTEK, G., REIJMAN, M., BOS, P.K., BRON, E.E., KLEIN, S., NASSERINEJAD, K., VAN OSCH, G.J.V.M., VERHAAR, J.A.N., KRESTIN, G.P., WEINANS, H., OEI, E.H.G. (2016): Is T1 $\rho$  Mapping an Alternative to Delayed Gadolinium-enhanced MR Imaging of Cartilage in the Assessment of Sulphated Glycosaminoglycan Content in Human Osteoarthritic Knees? An in Vivo Validation Study. *Radiology* **279**, 523–531. doi:10.1148/radiol.2015150693.
- WANG, A., PEDOIA, V., SU, F., ABRAMSON, E., KRETZSCHMAR, M., NARDO, L., LINK, T.M., MCCULLOCH, C.E., JIN, C., MA, C.B., LI, X. (2016): MR T1 $\rho$  and T2 of meniscus after acute anterior cruciate ligament injuries. *Osteoarthritis Cartilage* **24**, 631–639. doi:10.1016/j.joca.2015.11.012.
- WEISKOPF, N., SUCKLING, J., WILLIAMS, G., CORREIA, M.M., INKSTER, B., TAIT, R., OOI, C., BULLMORE, E.T., LUTTI, A. (2013a): Quantitative multi-parameter mapping of R1, PD(\*), MT, and R2(\*) at 3T. *Front Neurosci* **7**, 95. doi:10.3389/fnins.2013.00095.
- WEISKOPF, N., SUCKLING, J., WILLIAMS, G., CORREIA, M.M., INKSTER, B., TAIT, R., OOI, C., BULLMORE, E.T., LUTTI, A. (2013b): Quantitative multi-parameter mapping of R1, PD\*, MT, and R2\* at 3T. *Front. Neurosci.* **7**. doi:10.3389/fnins.2013.00095.

- WELSCH, G.H., APPRICH, S., ZBYN, S., MAMISCH, T.C., MLYNARIK, V., SCHEFFLER, K., BIERI, O., TRATTNIG, S. (2011): Biochemical (T2, T2\* and magnetisation transfer ratio) MRI of knee cartilage. *Eur Radiol* **21**, 1136–1143. doi:10.1007/s00330-010-2029-7.
- WELSCH, G.H., TRATTNIG, S., SCHEFFLER, K., SZOMONANYI, P., QUIRBACH, S., MARLOVITS, S., DOMAYER, S., BIERI, O., MAMISCH, T.C. (2008): Magnetization transfer contrast and T2 mapping in the evaluation of cartilage repair tissue with 3T MRI. *J Magn Reson Imaging* **28**, 979–986. doi:10.1002/jmri.21516.
- WILLIAMS, A., QIAN, Y., GOLLA, S., CHU, C.R. (2012): UTE-T2\* mapping detects sub-clinical meniscus injury after anterior cruciate ligament tear. *Osteoarthritis Cartilage* **20**, 486–494. doi:10.1016/j.joca.2012.01.009.
- ZARINS, Z.A., BOLBOS, R.I., PIALAT, J.B., LINK, T.M., LI, X., SOUZA, R.B., MAJUMDAR, S. (2010): Cartilage and meniscus assessment using T1rho and T2 measurements in healthy subjects and patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **18**, 1408–1416. doi:10.1016/j.joca.2010.07.012.
- ZENG, F., ZHA, Y., LI, L., XING, D., GONG, W., HU, L., FAN, Y. (2019): A comparative study of diffusion kurtosis imaging and T2\* mapping in quantitative detection of lumbar intervertebral disk degeneration. *Eur Spine J* **28**, 2169–2178. doi:10.1007/s00586-019-06007-z.
- ZHANG, X., MA, Y.-J., WEI, Z., WU, M., ASHIR, A., JERBAN, S., LI, S., CHANG, E.Y., DU, J. (2021): Macromolecular fraction (MMF) from 3D ultrashort echo time cones magnetization transfer (3D UTE-Cones-MT) imaging predicts meniscal degeneration and knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **29**, 1173–1180. doi:10.1016/j.joca.2021.04.004.

## 8. Publikationsverzeichnis

Ergebnisse dieser Dissertation wurden in zwei international anerkannten Fachzeitschriften mit Gutachtersystem (peer review) zur Veröffentlichung angenommen:

1. Veterinary Science (akzeptiert am 15.02.2023)

Special issue: Joint disease in companion animals

### **Histological Findings and T2 Relaxation Time in canine Menisci of Elderly Dogs—An Ex Vivo Study in Stifle Joints**

Lena Bunzendahl, Amir Moussavi, Martina Bleyer, Jana Dehnert, Susann Boretius and Stephan Neumann

Volume 10, Date 2023, Article

DOI: 10.3390/vetsci10030182

2. Frontiers in Veterinary Science (akzeptiert am 10.02.2025)

Sec. Diagnostic Imaging

### **Magnetisation transfer, T1 and T2\* relaxation in canine menisci of elderly dogs - an ex vivo study in stifle joints**

Lena Bunzendahl, Amir Moussavi, Martina Bleyer, Stephan Neumann and Susann Boretius

Volume 12, Date 2025, Article

DOI: 10.3389/fvets.2025.1521684

## 9. Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Arbeit, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Göttingen, den 23.09.2025

Mag. med.vet. Lena Bunzendahl-Först