

Untersuchungen zur Knorpelsteifigkeit und Knorpeldicke
des Kniegelenkes am distalen Femur des Pferdes im
Zusammenhang mit dem Kollagen- und Glykosamino-
glykangehalt des hyalinen Gelenkknorpels

MARTINA SPERLING



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



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Pferde (Chirurgie) mit
Lehrschmiede der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. L. – F. Litzke

**„Untersuchungen zur Knorpelsteifigkeit und Knorpeldicke des
Kniegelenkes am distalen Femur des Pferdes im Zusammenhang
mit dem Kollagen- und Glykosaminoglykangehalt des hyalinen
Gelenkknorpels“**

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

eingereicht von

Martina Sperling

Tierärztin aus Geislingen a.d. Steige

Gießen 2011

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

Dekan: Prof. Dr. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. L.-F. Litzke

Prof. Dr. A. Moritz

Tag der Disputation: 28.06.2011

Meinen Eltern

Erklärung

Ich erkläre:“ Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe sowie nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der *Satzung der Justus – Liebig - Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis* niedergelegt sind, eingehalten.“

Inhaltsverzeichnis:

Abkürzungsverzeichnis	7
Abbildungsverzeichnis	9
Tabellenverzeichnis	12
Einleitung und Aufgabenstellung	14
I Literatur	17
1. Zur Anatomie des equinen Kniegelenkes.....	17
1.1 Kniekehlgelenk(Art. femorotibialis).....	18
1.2 Kniescheibengelenk(Art. femoropatellaris).....	19
1.3 Der distale Femur des Pferdes.....	21
1.4 Muskeln, Sehnen, Sehnenscheiden und Schleimbeutel.....	21
2. Aufbau und Physiologie des synovialen Gelenkes.....	23
3. Knorpel und Arthrose.....	24
3.1 Knorpelgewebe.....	24
3.1.1 hyaliner Knorpel.....	24
3.1.2 Faserknorpel.....	24
3.1.3 Elastischer Knorpel.....	25

3.2	Osteoarthrose.....	25
3.2.1	Osteoarthritis oder Osteoarthrose.....	29
3.2.2	Die equine Osteochondrosis dissecans (OCD).....	31
3.3	Chondrozyten des hyalinen Knorpels.....	32
3.4	Aufbau und Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM).....	33
3.4.1	Kollagen.....	34
3.4.2	Proteoglykane.....	38
3.5	Die vier Schichten des hyalinen Knorpels.....	40
4.	Die Biomechanik des Gelenkknorpels.....	42
4.1	Mechanische Stimulation des Gelenkknorpels.....	46
4.2	Die mechanische Überbeanspruchung des Gelenkknorpels.....	47
4.3	Ansatzpunkte zur Diagnose von geschädigtem Knorpel.....	49
4.4	Knorpeldicke.....	59
4.4.1	Möglichkeiten zur Bestimmung der Knorpeldicke.....	61
II	Material und Methoden	64
5.	Tiermaterial.....	64
6.	Geräte und Untersuchungsverfahren.....	65

6.1	Präparation des distalen Femur.....	65
6.2	Makroskopische Untersuchung des distalen Femur.....	65
6.3	Gerät zur Messung der Knorpelsteifigkeit.....	66
6.3.1	Messung der Knorpelsteifigkeit.....	68
6.4	Gerät zur Messung des Knorpeldicke.....	71
6.4.1	Messung der Knorpeldicke.....	71
6.5	Probenentnahme zur Bestimmung des Glykosaminoglykan- und Kollagengehaltes.....	72
6.6	Bestimmung des Glykosaminoglykangehaltes.....	74
6.7	Bestimmung des Kollagengehaltes.....	77
7.	Auswertung und Biometrie.....	81
7.1	Statistische Auswertung der Messwerte Knorpelsteifigkeit und Knorpeldicke bzw. Kollagen und Glykosaminoglykane bezüglich der Lokalisationen.....	81
7.2	Vergleich von Knorpelsteifigkeit und -dicke zwischen lateralen und medialen Gelenkarealen.....	81
7.3	Statistische Auswertung zur Messmethodik des Parameters Knorpelsteifigkeit.....	82
7.4	Korrelation zwischen den Parametern Knorpelsteifigkeit, Knorpeldicke, Glykosaminoglykan- und Kollagengehalt	82

III	Ergebnisse	84
8.1	Ergebnisse zur Knorpelsteifigkeit am distalen Femur.....	84
8.1.1	Ergebnisse zum Seiten-, Reihen und Positionsvergleich der Knorpelsteifigkeit an den verschiedenen Messpunkten.....	88
8.1.2	Ergebnisse zum Vergleich der Knorpelsteifigkeit zwischen lateralen und medialen Gelenkarealen.....	89
8.1.3	Ergebnisse zur Messmethodik.....	91
8.2	Ergebnisse zur Knorpeldicke am distalen Femur.....	93
8.2.1	Ergebnisse zum Seiten, Reihen- und Positionsvergleich der Knorpeldicke an den verschiedenen Messpunkten.....	96
8.2.2	Ergebnisse zum Vergleich der Knorpeldicke zwischen lateralen und medialen Gelenkarealen.....	97
8.3	Ergebnisse zum Glykosaminoglykangehalt.....	99
8.3.1	Ergebnisse zum Seiten, Reihen- und Positionsvergleich des Glykosaminoglykangehaltes an den verschiedenen Messpunkten.....	101
8.4	Ergebnisse zum Kollagengehalt.....	104
8.4.1	Ergebnisse zum Seiten, Reihen- und Positionsvergleich des Kollagengehaltes an den verschiedenen Messpunkten.....	107
8.5	Ergebnisse zur Korrelation zwischen der Knorpelsteifigkeit und der Knorpeldicke.....	110
8.5.1	Ergebnisse zur Korrelation zwischen der Knorpelsteifigkeit und dem Kollagengehalt.....	112
8.5.2	Ergebnisse zur Korrelation zwischen der Knorpeldicke und dem Kollagengehalt.....	113

8.5.3	Ergebnisse zur Korrelation zwischen der Knorpelsteifigkeit bzw. Knorpeldicke und dem Glykosaminoglykangehalt.....	114
8.5.4	Ergebnisse zum Einfluss der Körpermasse.....	115
IV	Diskussion	116
9.1	Bestimmung der Knorpelsteifigkeit.....	116
9.2	Bestimmung der Knorpeldicke.....	119
9.3	Der Einfluss der Knorpeldicke auf die Messwerte zur Knorpelsteifigkeit.....	121
9.4	Ergebnisse zum Glykosaminoglykangehalt.....	125
9.5	Ergebnisse zum Kollagengehalt.....	125
9.6	Vergleich Knorpelsteifigkeit bzw. Knorpeldicke mit den Knorpelbestandteilen Glykosaminoglykane und Kollagen.....	126
9.7	Zusammenhang zwischen der Knorpeldicke und der Körpermasse der Pferde.....	127
V	Zusammenfassung	128
VI	Summary	132
VII	Schriftum	136
VIII	Tabellarische Darstellung der Messdaten	150
IX	Danksagung	166
X	Abb. 19	167

Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata
Art.	Articulatio
a	Zapfenradius
bzw.	beziehungsweise
bzgl.	bezüglich
ca.	circa
Da	Dalton
d.h.	das heisst
DMMB	Dimethylmethylenblau
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Young'sche Modul
ECM	extrazelluläre Matrix
F	ausgeübte Kraft
Fa.	Firma
g	$g = 9,81 \text{ m/s}^2$ (Erdbeschleunigung)
GAG	Glykosaminoglykane
GBSS	Gey's balanced salt solution
h	Knorpeldicke
HHGS	Histological/Histochemical Grading System
ICC	Intraclass correlation coefficient
k	Faktor der die Knorpeldicke berücksichtigt
Lig.	Ligamentum
M	Mega

M.	Musculus
Mean	Mittelwert
MPa	Megapascal
MRT	Magnetresonanztomographie
N	Newton
OCD	Osteochondrosis dissecans
Pa	Pascale (1 Pa = 1 kg*m⁻¹*s⁻² = 1 N*m⁻²)
Rec.	Recessus
u. a.	unter anderem
v	Poisson's ratio
ω	Verformung

Abbildungsverzeichnis

1. Korrelation zwischen den gemessenen Werten.....	16
2. Linkes Kniegelenk des Pferdes, Gelenkkapseln entfernt, Medialansicht.....	17
3. Linkes Kniegelenk des Pferdes, Gelenkkapseln entfernt, Ansicht von kaudomedial....	20
4. Linkes Kniegelenk des Pferdes, Darstellung der Knochen, Muskeln, Bänder und Synovialen Einrichtungen, Ansicht von kраниomedial.....	22
5. Alpha-Ketten mit geregelter Aminosäuresequenz.....	35
6. Die Stufen beim Aufbau von der Tripelhelix zur Fibrille.....	36
7. Proteoglykan-Aufbau als Polyanion und Position der negativen Ladungen auf dem Glykosaminoglykan - Monomer.....	38
8. Proteoglykan - Aggregate im Netzwerk der Kollagenfasern.....	39
9. Knorpelaufbau.....	41
10. Arkadenförmige Struktur der Kollagenfasern im Gelenkknorpel und Spaltlinien, die den tangentialen Verlauf repräsentieren.....	42
11. Repulsion der fixierten negativen Ladungen.....	43
12. Artscan® 200 Messsystem.....	66
13. Artscan® 200 Messsonde.....	67
14. Referenzplatte und Indenter (vorderes Ende der Sonde).....	68
15. 26 Messpunkte zur Knorpelsteifigkeits- und Knorpeldickenmessung am rechten Femur.....	69
16. Monitorbild des Programms Artscan.....	70
17. Linearschallkopf vom Typ 739L zur Messung der Knorpeldicke.....	71
18. Ultraschallbild von Pferd Nr. 17, linkes Knie zur Darstellung und Bestimmung der Knorpeldicke.....	72
19. Lokalisation der einzelnen Messpunkte zur Bestimmung des Glykosaminoglykan- und Kollagengehaltes im hyalinen Gelenkknorpel.....	73
20. Probenentnahme zur Bestimmung des Glykosaminoglykan- und Kollagengehaltes mit einer Knorpel-Knochenstanze (Smith&Nephew, Marl; Durchmesser: 4,5 mm).....	74

21. Eppendorf-Kühlzentrifuge (eppendorf advantage 541 5R, Fa. AL-Labortechnik, Amstetten).....	76
22. Photometrische Bestimmung des Glykosaminoglykangehaltes; Probenüberstand in einer 96 - Well Platte mit 250 µl DMMB - Lösung überschichtet.....	76
23. Standardkurve DMMB-Assay zur Ermittlung des Glykosamioglykangehaltes in µg/mg Knorpel.....	77
24. Einengung der Proben unter Stickstoff in einer Reacti-Vap® Evaporating unit (Fa. Pierce Chemical Company, Box 117, Rockford IL 61105).....	79
25. Eichkurve Hydroxyprolinstandard zur Bestimmung des Hydroxyprolinegehalts in µg/mg Knorpel bei Pferd Nr. 26, bestimmt am 12.10.09.....	80
26. Mittelwerte zur Knorpelsteifigkeit in Newton mit Standardabweichung am rechten Knie bei 15 Pferden.....	87
27. Mittelwerte zur Knorpelsteifigkeit in Newton mit Standardabweichung am linken Knie bei 15 Pferden.....	87
28. Mittelwerte zur Knorpelsteifigkeit in Newton mit Standardabweichung am rechten Knie bei 15 Pferden; nach Reihen geordnet.....	90
29. Mittelwerte zur Knorpelsteifigkeit in Newton mit Standardabweichung am linken Knie bei 15 Pferden; nach Reihen geordnet.....	90
30a. Veränderung der Mittelwerte zur Knorpelsteifigkeit zwischen 1. und 2. Messung.....	91
30b. Veränderung der Mittelwerte zur Knorpelsteifigkeit zwischen 3. und 4. Messung.....	92
31a. Veränderung der Mittelwerte zur Knorpelsteifigkeit zwischen Durchgang 1 und 2...92	
31b. Veränderung der Mittelwerte zur Knorpelsteifigkeit zwischen 1. und 3. Messung.....	93
32. Mittelwerte zur Knorpeldicke in mm mit Standardabweichung am rechten Knie bei 15 Pferden.....	95
33. Mittelwerte zur Knorpeldicke in mm mit Standardabweichung am linken Knie bei 15 Pferden.....	95
34. Mittelwerte zur Knorpeldicke in mm mit Standardabweichung am rechten Knie bei 15 Pferden; nach Reihen geordnet.....	98
35. Mittelwerte zur Knorpeldicke in mm mit Standardabweichung am linken Knie bei 15 Pferden; nach Reihen geordnet.....	98
36. Mittelwerte zum Glykosaminoglykangehalt in µg/mg Knorpel mit Standardabweichung am rechten Knie bei 15 Pferden.....	100

37. Mittelwerte zum Glykosaminoglykangehalt in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Knorpel mit Standardabweichung am linken Knie bei 15 Pferden.....	101
38. Mittelwerte zum Glykosaminoglykangehalt in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Knorpel mit Standardabweichung am rechten Knie bei 15 Pferden; nach Reihen geordnet.....	103
39. Mittelwerte zum Glykosaminoglykangehalt in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Knorpel mit Standardabweichung am linken Knie bei 15 Pferden; nach Reihen geordnet.....	104
40. Mittelwerte Hydroxyprolingehalt in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Knorpel mit Standardabweichung am rechten Knie bei 15 Pferd.....	106
41. Mittelwerte Hydroxyprolingehalt in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Knorpel mit Standardabweichung am linken Knie bei 15 Pferd.....	106
42. Mittelwerte Hydroxygehalt in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Knorpel mit Standardabweichung am rechten Knie bei 15 Pferden; nach Reihen geordnet.....	109
43. Mittelwerte Hydroxygehalt in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Knorpel mit Standardabweichung am linken Knie bei 15 Pferden; nach Reihen geordnet.....	109
44. Lineare Korrelation zwischen der Knorpeldicke in mm und der Knorpelsteifigkeit in N an der Position B1 bei 30 Kniegelenken.....	111
45. Darstellung der Beziehung zwischen der Knorpeldicke in mm und der Knorpelsteifigkeit in N (52 Messwerte/Pferd; Pseudoreplikation).....	112
46. lineare Korrelation zwischen der Knorpelsteifigkeit in N und dem Hydroxyprolingehalt in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Knorpel	113
47. lineare Korrelation mit der Knorpeldicke in mm und dem Hydroxyprolingehalt in $\mu\text{g}/\text{mg}$	114
48. lineare Korrelation zwischen der Körpermasse in kg und der Knorpeldicke in mm	115
49. Einfluss der Knorpeldicke auf die Indentermessung nach Lyyra et al. (1999).....	124

Tabellenverzeichnis

1. Histologisches/Histochemisches Beurteilungsschema zur Knorpelbeschaffenheit bei Osteoarthrose (HHGS) beschrieben durch Mankin et al.(1971).....	27
2. Histopathologisches Beurteilungsschema zum Gelenkknorpel bei Osteoarthrose (OARSI) nach Custers et al. (2007).....	28
3. Arthroseschema und Gradeinteilung nach Collins (Collins et al. 1949).....	29
4. Mittelwerte zur Knorpeldicke in mm mit Standardabweichung beim Mensch und verschiedenen Tierarten an unterschiedlichen Lokalisationen.....	60
5. Alter, Rasse, Geschlecht und Körpermasse der untersuchten Tiere.....	64
6. Übersicht der Mittelwerte zur Knorpelsteifigkeit in N mit Standardabweichung am rechten Knie bei 15 Pferden	85
7. Übersicht der Mittelwerte zur Knorpelsteifigkeit in N mit Standardabweichung am linken Knie bei 15 Pferden.....	86
8. p-Werte zur Knorpelsteifigkeit (KS) ohne/mit Position D mit den Haupteffekten Seite, Reihe, Position sowie den Wechselwirkungen Seite – Reihe, Seite – Position), Reihe – Position.....	89
9. Übersicht der Mittelwerte zur Knorpeldicke im mm mit Standardabweichung am rechten Knie bei 15.....	93
10. Übersicht der Mittelwerte zur Knorpeldicke im mm mit Standardabweichung am linken Knie bei 15 Pferden	94
11. p-Werte zur Knorpeldicke (KD) ohne/mit Position D mit den Haupteffekten Seite, Reihe, Position sowie den Wechselwirkungen Seite – Reihe, Seite – Position, Reihe – Position.....	97
12. Übersicht der Mittelwerte zum Glykosaminoglykangehalt in µg/mg Knorpel mit Standardabweichung am rechten Knie bei 15 Pferden	99
13. Übersicht der Mittelwerte zum Glykosaminoglykangehalt in µg/mg Knorpel mit Standardabweichung am linken Knie bei 15 Pferden.....	100

14. p-Werte zum Glykosaminoglykangehalt (GAG) ohne/mit Position D mit den Haupteffekten Seite, Reihe, Position sowie den Wechselwirkungen Seite – Reihe, Seite – Position, Reihe – Position.....	103
15. Übersicht der Mittelwerte zum Hydroxyprolingehalt in µg/mg Knorpel mit Standardabweichung und errechnetem Kollagengehalt am rechten Knie bei 15 Pferden.....	105
16. Übersicht der Mittelwerte zum Hydroxyprolingehalt in µg/mg Knorpel mit Standardabweichung und errechnetem Kollagengehalt am linken Knie bei 15 Pferden.....	105
17. p-Werte zum Hydroxyprolingehalt (Hyp) ohne/mit Position D mit den Haupteffekten Seite, Reihe, Position sowie den Wechselwirkungen Seite – Reihe, Seite – Position, Reihe – Position.....	108

Einleitung und Aufgabenstellung

Degenerative Gelenkerkrankungen beim Pferd stellen für Tierärzte eine große Herausforderung dar. Die häufigsten Ursachen für Knorpelschäden sind entweder durch Traumata bedingt oder ursächlich auf die sogenannte „Osteochondrosis dissecans“ zurückzuführen.

Eine normale Gelenkfunktion ist ohne einen intakten Gelenkknorpel nicht möglich.

Wegweisend bei der Diagnose zur Erkennung einer Gelenkerkrankung sind die klinische Lahmheitsuntersuchung einschließlich Provokationsproben und diagnostischen Anästhesien, bildgebende Verfahren sowie die Synoviaanalyse und die diagnostische Arthroskopie. Die am häufigsten verwendeten bildgebenden Verfahren sind das Röntgen und die Sonographie. Zunehmend kommen die Computertomographie und die Magnetresonanztomographie zum Einsatz, aber auch Verfahren wie die Szintigraphie und die Thermographie können in der Veterinärmedizin bei orthopädischen Erkrankungen eingesetzt werden.

Nach de Grauw et al. (2006) sind osteoarthrotische Veränderungen im Gelenk bereits vorhanden, bevor dies röntgenologisch festgestellt werden kann.

Die Untersuchung auf Knorpelabriebprodukte in der Synovia stellt bezüglich der Prognosestellung und des Therapieansatzes eine einfache minimalinvasive Methode dar. Ein Fortschreiten einer degenerativen Gelenkerkrankung kann mit dieser Methode besser eingeschätzt werden. Derzeit fehlen aber noch auf dem Markt validierte und standardisierte Messmethoden (de Grauw et al. 2006).

Ein sehr wichtiger Punkt für die Diagnostik von Knorpelschäden ist die Prüfung der biomechanischen Eigenschaften des Knorpels. Makroskopisch intakter Gelenkknorpel kann bereits veränderte biomechanische Eigenschaften aufweisen.

Eines der ersten Anzeichen einer Osteoarthrose im Frühstadium ist der Verlust der natürlichen Stabilität und Integrität des Knorpelgewebes, die Chondromalazie. Hauptsächlich dafür verantwortlich sind der Proteoglykanverlust sowie ein geschädigtes Kollagenetzwerk.

Zahlreichen Literaturangaben zufolge ist die mechanische Prüfung des Gelenkknorpels bisher schon in vielfältiger Weise unter Laborbedingungen durchgeführt worden. Mehrere Ansätze zur Untersuchung im Rahmen der diagnostischen Arthroskopie sind aufgrund fehlender Geräte gescheitert oder wurden anhand nicht validierter und nicht standardisierter Messmethoden durchgeführt. Lediglich die visuelle Beurteilung sowie der Eindrückttest stehen bisher bei der Früherkennung von Knorpelschäden für die Arthroskopie zur Verfügung (Oakley et al. 2005).

Durch die Arbeitsgruppe um Lyrra wurde 1997 ein optimiertes neues Verfahren vorgestellt, um während Arthroskopien die Prüfung von biomechanischen Eigenschaften des Knorpels zu ermöglichen. Dieses Verfahren wurde seit 1995 von der Firma Artscan medical innovations auf dem Markt bis vor kurzem angeboten und noch kommerziell vertrieben.

Für die Diagnostik von bereits degeneriertem Knorpel in frühen Stadien wären Studien sinnvoll, die auf physiologischen Grunddaten beruhen. Bisher sind in der Literatur kaum Informationen zum gesunden Gelenkknorpel beim Pferd beschrieben.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Referenzwerte zur Knorpelsteifigkeit und Knorpeldicke am Kniegelenk des Pferdes zu ermitteln. Zusätzlich werden die Knorpelbestandteile Glykosaminoglykane und Kollagen bestimmt. Diese Messergebnisse sowie die Korrelation der einzelnen Messdaten sollen als Grundlage in der Arthroseforschung am Pferd dienen.

Zielstellung:

- 1.) Bestimmung von Referenzwerten zur Knorpelsteifigkeit und Knorpeldicke in verschiedenen Arealen des Femoropatellar- und Femorotibialgelenkes am distalen Femur beim Pferd.
- 2.) Es ist zu prüfen, wie hoch die Knorpelsteifigkeit und die Knorpeldicke in verschiedenen Arealen des Kniegelenkes sind.
- 3.) Im Bereich der gemessenen Knorpelareale soll quantitativ der Glykosaminoglykan- und der Kollagengehalt bestimmt werden.

4.) Untersucht werden soll die Korrelation zwischen der Knorpelsteifigkeit und der Knorpeldicke sowie den Knorpelbestandteilen Glykosaminoglykane und Kollagen (Abb. 1).

5.) Es ist zu prüfen, welchen Einfluss die Messmethode einer vierfachen Messung am gleichen Punkt auf die Messergebnisse zur Knorpelsteifigkeit besitzt.

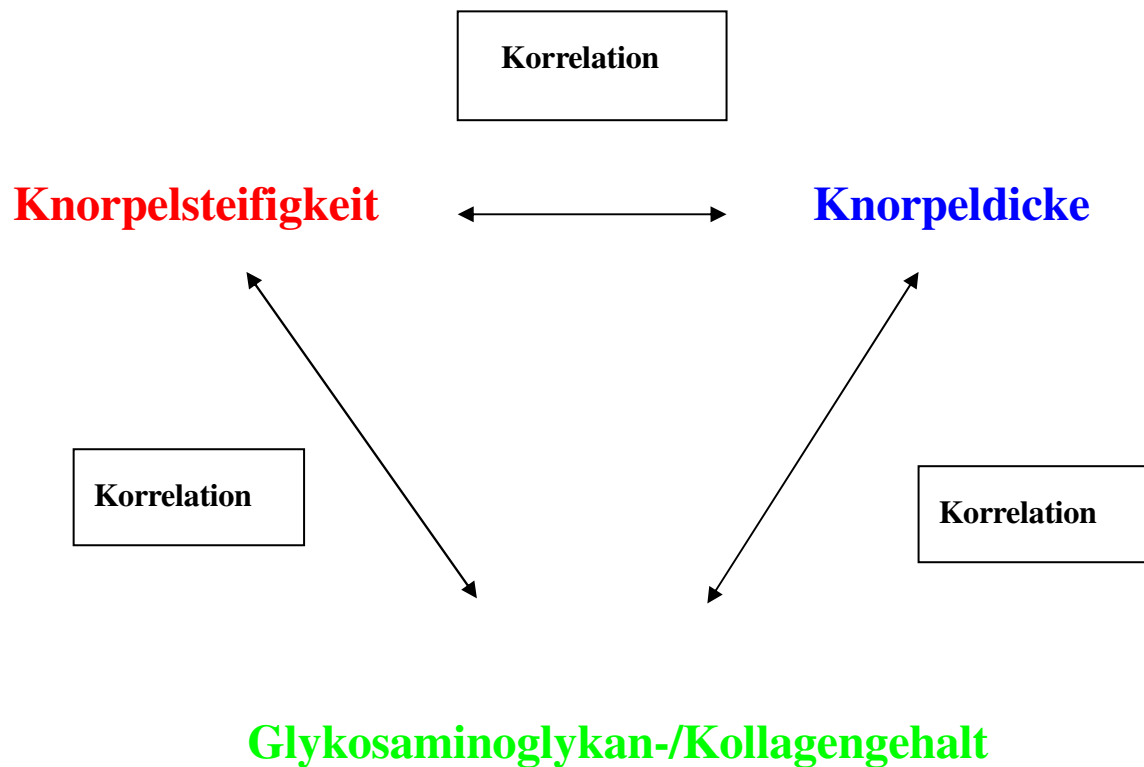


Abb.1: Korrelation zwischen den gemessenen Werten

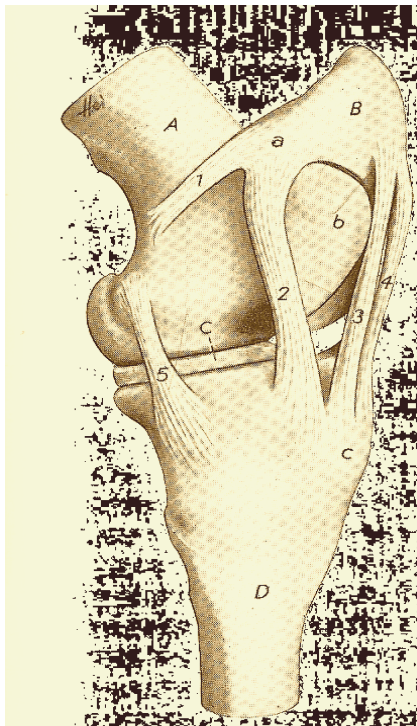
I. Literatur

1. Zur Anatomie des equinen Kniegelenkes

Die beiden Anteile des Kniegelenkes, das

- Kniekehlgelenk (*Art. femorotibialis*) und das
- Kniescheibengelenk (*Art. femoropatellaris*)

stehen in enger funktioneller Abhängigkeit zueinander.



Legende:

A Os femoris; B Patella; C Meniscus medialis; D Tibia

a Fibrocartilago parapatellaris medialis; b medialer Rollkamm; c Tuberositas tibiae

1 Ligamentum (Lig.) femoropatellare mediale; 2 mediales, 3 mittleres, 4 laterales Kniescheibenband; 5 Ligamentum collaterale mediale

Abb. 2: Linkes Kniegelenk des Pferdes. Gelenkkapseln entfernt. Medialansicht (nach Nickel et al. 1992)

1.1 Das Kniekehlgelenk (Art. femorotibialis)

Das Kniekehlgelenk ist ein Spiralgelenk, welches als Wechselgelenk arbeitet. Man bezeichnet es auch als so genanntes inkongruentes Gelenk, da die Gelenkflächen, bestehend aus den beiden Femurkondylen und den beiden Kondylen der Tibia, nicht aufeinander passen (Wissdorf et al. 2002). Zum Ausgleich ist lateral und medial ein Meniskus articularis eingeschoben. Die Menisken bestehen aus Faserknorpel und sind halbmondförmig. Ihre Form ist peripher dicker als an der konkaven Innenseite (Abb. 3).

Jeder Meniskus besitzt ein kraniales (Ligamentum tibiale craniale menisci lateralis bzw. medialis) und ein kaudales Halteband zur Tibia (Ligamentum tibiale caudale menisci lateralis bzw. medialis).

Zusätzlich zieht das Ligamentum meniscofemorale vom kaudalen Rand des lateralen Meniskus zur interkondylaren Fläche des medialen Femurkondylus (Nickel et al. 1992).

Im Zentrum liegen zwischen den Synovialwänden der beiden Gelenksäcke und damit extraartikulär (Wissdorf et al. 2002) zwei gekreuzte Bänder, das

- *Ligamentum cruciatum craniale* und das
- *Ligamentum cruciatum caudale*.

Sie stabilisieren das Kniegelenk in kraniokaudaler Richtung.

Die beiden Seitenbänder, das

- *Ligamentum collaterale laterale* und das
- *Ligamentum collaterale mediale*

stabilisieren das Kniekehlgelenk in mediolateraler Richtung. Sie sind durch die Haut palpierbar. Das laterale Seitenband entspringt am lateralen Bandhöcker des Femur und inseriert distal am Condylus lateralis der Tibia sowie am Caput fibulae. Das mediale Seitenband besitzt oftmals eine Zwischeninsertion am medialen Meniskus. Vom medialen Bandhöcker kommend setzt es am Condylus medialis der Tibia an (Wissdorf et al. 2002).

1.2 Kniescheibengelenk (Art. femoropatellaris)

Das Kniescheibengelenk ist ein Schlittengelenk, es ermöglicht proximodistale Bewegungen der Patella über die Trochlea ossis femoris. Diese dient als Gleitfläche und trennt den medialen Rollkamm der Trochlea von ihrem kleineren etwas weiter distal beginnenden lateralen Rollkamm. Der mediale Rollkamm ist bis weit nach proximal und medial von Gelenkknorpel bedeckt. Der laterale Rollkamm hingegen ist lateral nur wenig mit Knorpel überzogen. Seine Form ist gleichmäßig (Nickel et al. 1992).

Die Patella ist ein prismatisch geformtes Sesambein, eingelagert in der Endsehne des Musculus quadriceps femoris. Die Facies articularis der Patella ist medial vergrößert durch die Fibrocartilago parapatellaris und einem lateral gelegenen knorpeligen Streifen. Trotzdem ist sie kleiner als die Gelenkfläche der Trochlea des Os femoris. In seltenen Fällen kann die Patella nicht angelegt sein (Wissdorf et al. 2002).

In Ruhestellung fixieren die Fibrocartilago parapatellaris sowie das mediale Kniescheibenband die Patella mit ihrer schmalen distalen Gelenkfläche auf dem medialen Rollkamm.

Die Gelenkkapsel des Kniescheibengelenks ist voluminös und kommuniziert immer mit dem medialen Kniekehlgelenksack, teilweise auch mit dem lateralen Kniekehlgelenksack. Eine Aussackung, die sich proximal unter dem Musculus quadriceps femoris befindet, wird als Recessus (Rec.) suprapatellaris bezeichnet.

Bei den Bändern des Kniescheibengelenkes handelt es sich um das

- *Ligamentum patellae intermedium* und um die
- *Retinacula patellae* (Haltebänder).

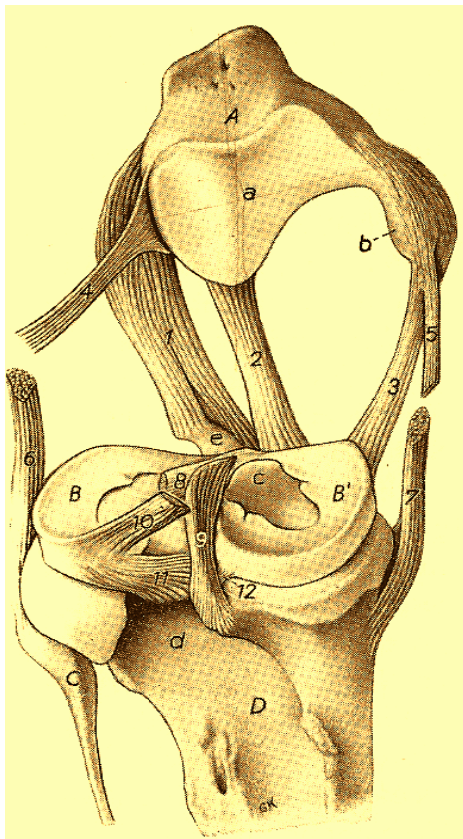
Diese Haltebänder fixieren die Patella als Verstärkung der Faszien am Oberschenkelbein. Das *Ligamentum femoropatellare laterale* und *mediale* zieht von der Patella jeweils lateral bzw. medial seitlich an den Femur.

Das Pferd besitzt drei gerade Kniescheibenbänder.

Das *Ligamentum patellae laterale* ist kräftiger und endet am proximalen Rand der Tuberositas tibiae. Das schwächere mediale Kniescheibenband (*Ligamentum patellae mediale*) endet am medialen Rand der Tuberositas tibiae.

Das Ligamentum patellae intermedium setzt im Sulcus tuberositas tibiae an. Es bildet die Endsehne des Musculus (M.) quadriceps, in die auch die Patella eingelagert ist (Wissdorf et al. 2002).

Zwischen den geraden Kniescheibenbändern und der Gelenkkapsel sowie unter der Patella liegt ein Fettkörper, das so genannte Corpus adiposum infrapatellare (Nickel et al. 1992).



Legende:

**A Patella; B, B' Meniscus lateralis bzw. medialis;
C Fibula; D Tibia**

**a Facies articularis patellae; b Fibrocartilago
parapatellaris medialis; c Tuberculum mediale der
Eminentia intercondylaris; d Incisura poplitea;
e Tuberositas tibiae**

**1-3 Kniescheibenbänder: Lig. patellae laterale (1),
intermedium(2) bzw. mediale(3); Lig. femoropatellare
laterale bzw. mediale; 6, 7 Lig. collaterale laterale bzw.
mediale; 8, 9 Lig. cruciatum craniale bzw. caudale; 10
Lig. meniscofemorale; 11, 12 Lig. tibiale caudale menisci
lateralis bzw. medialis**

Abb. 3: Linkes Kniegelenk des Pferdes.

Os femoris und Gelenkkapseln entfernt. Ansicht von kaudomedial (nach Nickel et al. 1992)

1.3 Der distale Femur des Pferdes

Der Oberschenkelknochen (Femur) ist der kräftigste von allen langen Röhrenknochen. Sein distales Ende artikuliert mit der Tibia und der Patella. Die Artikulation mit dem Schienbein wird durch den Condylus medialis und lateralis ermöglicht, die durch die Fossa intercondylaris voneinander getrennt sind und nach kaudodistal ausgerichtet liegen (Abb. 2).

Die kranial liegende Fossa extensoria, stellt das Ursprungsgebiet der Musculi extensor digitalis longus und peroneus tertius dar, aus der kaudal liegenden Fossa entspringt der Muculus popliteus. An den Kondylen setzen zusätzlich lateral und medial die Seitenbänder an (Wissdorf et al. 2002).

Die kranial liegende Trochlea artikuliert mit der Patella.

Durch den so genannten passiven Stehapparat kann das Kniegelenk des Pferdes „gesperrt“ werden. Dabei übernimmt eine Hintergliedmaße einen unverhältnismäßig großen Teil der Körperlast, die andere Hintergliedmaße kann währenddessen entlastet werden. Bei dieser Stellung wird Energie gespart, die Muskelwirkung aber nicht vollständig ausgeschaltet. Folglich muss das Körpergewicht von einem Bein auf die andere Gliedmaße verlagert werden, weil die Muskeln ermüden und die längere Spannung des passiven Stützapparates unbequem wird. Der Sperrmechanismus entsteht durch die asymmetrische Form der Trochlea ossis femoris (Dyce et al 1997).

1.4 Muskeln, Sehnen, Sehnenscheiden und Schleimbeutel

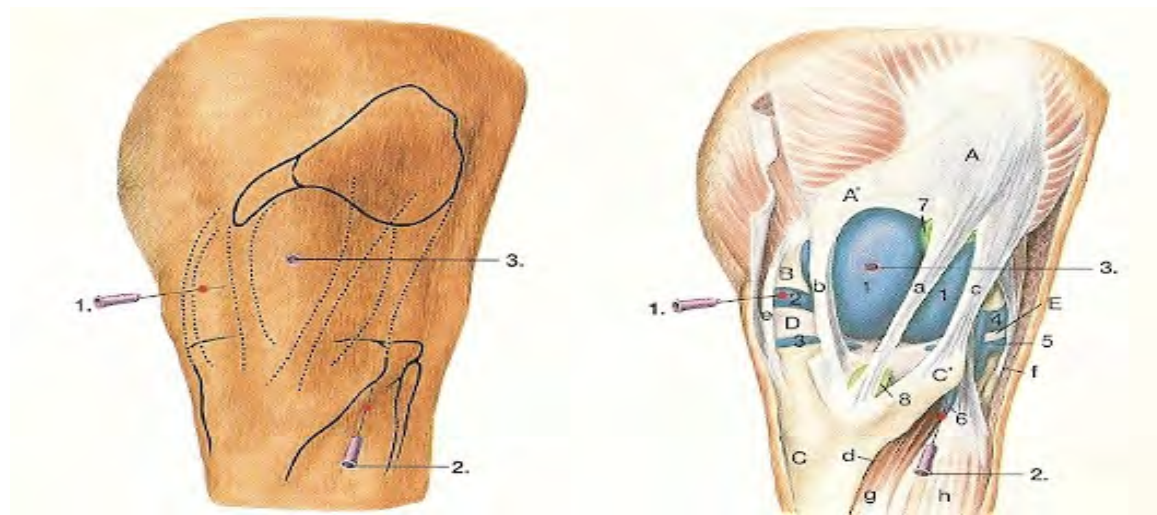
Die vier Köpfe des Musculus quadriceps femoris inserieren gemeinsam an der Patella. Ihre Hauptfunktion ist die Streckung des Knie- sowie die Beugung des Hüftgelenkes. Die Endsehne des Musculus rectus femoris, der den stärksten der vier Anteile des Musculus quadriceps femoris repräsentiert, setzt im Sulcus tuberositas tibiae an und bildet somit das mittlere Kniescheibenband. Sie wird distal an der Patella von der Bursa infrapatellaris proximalis und an der Insertionsstelle der Tuberositas tibiae von der Bursa infrapatellaris distalis unterlagert (Kainer 1989).

Die Musculi semimembranosus, sartorius und gracilis unterstützen bei der physiologischen Patellafixation das Festhaken der Patella auf dem medialen Rollkamm. Beim Lösen der physiologischen Patellafixation ist auch der kraniale Ast des M. biceps beteiligt. Der mittlere

Ast überdeckt den Ursprung der lateral gelegenen Muskeln des Unterschenkels, Musculus extensor digitalis longus und Musculus extensor digitalis lateralis und den Nervus peroneus communis (Wissdorf et al. 2002).

Der Recessus subpopliteus, welcher eine Aussackung des lateralen Kniegelenksackes bildet, umfasst die Ursprungssehne des Musculus popliteus zwischen dem lateralen Seitenband und dem lateralen Meniscus.

Die Kniefaszie (*Fascia genus*) entspringt lateral und medial aus der Oberschenkelfaszie. Ihre Ansatzpunkte sind die Kondylen des Os femoris am lateralen und medialen Kniescheibenband. An dieser Stelle erfolgt der Übergang in die Unterschenkelfaszie (Dyce et al. 1991).



Darstellung der Knochen, Muskeln, Bänder und synovialen Einrichtungen sowie der Punktionsmöglichkeiten des linken Kniegelenkes, Ansicht von kraniomedial. Infrapatellarer Fettkörper entfernt.

A Patella, A' ihre Fibrocartilago patellae; B Os femoris; C Tibia, C' Tuberositas tibiae; D medialer, E lateraler Meniscus

a Lig. patellae intermedium; b, c Lig. patellae mediale bzw. laterale; d Margo cranialis tibiae; e Lig. collaterale mediale; f Lig. collaterale laterale; g M. tibialis cranialis; h M. extensor digitalis longus

1. Gelenkkapsel des Kniescheibengelenkes; 2, 3 proximale bzw. distale Bucht des medialen Kniekehlgelenksacks; 4, 5 proximale bzw. distale Bucht des lateralen Kniekehlgelenksacks; 6 Rec. subextensorius; 7 Bursa infrapatellaris proximalis; 8 Bursa infrapatellaris distalis

1. Punktion der medialen Abteilung des Kniekehlgelenkes

2. Punktion der lateralen Abteilung des Kniekehlgelenkes durch den Rec. subextensorius

3. Punktion des Kniescheibengelenkes

Abb. 4: Linkes Kniegelenk, Ansicht von kraniomedial

Darstellung der Knochen, Muskeln, Bänder und synovialen Einrichtungen aus Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH: Gelenkpunktion der Gliedmaßen des Pferdes. Legende erweitert.

2. Aufbau und Physiologie des synovialen Gelenkes

Synoviale Gelenke sind bewegliche Verbindungen von zwei oder mehreren Knochen, die von einer Gelenkkapsel (Capsula articularis) umgeben werden. Die artikulierenden Knochen, die innerhalb einer Gelenkhöhle (Cavum articulare) liegen, sind mit hyalinem Knorpel überzogen. Von diesem ist abhängig, ob das Gelenk bis ins hohe Alter seine Funktion unbeschadet fortsetzen kann. Der hyaline Knorpel ist gegenüber Druck- und Scherkräften elastisch, widerstandsfähig und von Synovia umgeben (siehe Kapitel 3 und 4).

Die Gelenkkapsel verbindet die am Gelenk beteiligten Knochen und schließt die Gelenkhöhle weitgehend luftdicht ab. Sie besteht aus einer äußeren Schicht aus straffem Bindegewebe (Stratum fibrosum) und einer inneren Schicht (Stratum synoviale) aus lockerem gefäßreichem Bindegewebe. Das Stratum fibrosum bildet den Übergang zum Periost bzw. zum Perichondrium und stabilisiert das Gelenk. In der inneren Schicht erfolgt die Innervation und die Vaskularisation (Litzke 2004).

Das Stratum synoviale produziert Gelenkflüssigkeit, welche gegenüber dem Knorpel nutritive Eigenschaften besitzt und den Reibungswiderstand zwischen den Gelenkkomponenten herabsetzt. Hauptsächlich wird dies durch das Hyaluronat gewährleistet. Basierend auf einem Glykoprotein - Gleitfaktor ist eine Grenzflächenschmierung von Knorpel auf Knorpel möglich. Ebenso wird die Gleitfähigkeit bei stärkeren Belastungen zwischen Gelenkknorpelflächen durch die hydrostatische Schmierung ermöglicht. Hierbei handelt es sich um die interstitielle Knorpelflüssigkeit und einen Flüssigkeitsfilm aus Synovia, welche die Knorpelflächen überziehen (Litzke 2004).

Die Synoviozyten bilden eine „Intima“ aus ein bis vier Zellagen. Die Zusammensetzung der Gelenkflüssigkeit wird stets durch die Permeabilitätsschranke kontrolliert. Diese wird repräsentiert durch die Interzellularspalten zwischen den Synoviozyten und der Synovialmembran. Zusätzlich übernimmt das Stratum synoviale phagozytotische Aufgaben (Liebich et al. 1990).

Die Bänder (Ligamenta) der Gelenke bestehen aus straffem Bindegewebe. Sie bestehen aus zahlreichen parallel verlaufenden Kollagenfasern. Durch den Übergang der Ligamenta und der Gelenkkapsel in mineralisierten Faserknorpel und die Insertion in den Knochen wird eine gleichmäßige Lastverteilung erreicht (Liebich et al. 1990).

3. Knorpel und Arthrose

3.1 Knorpelgewebe (Textus cartilagineus)

Das Knorpelgewebe entwickelt sich ursprünglich aus dem mesenchymalen Bindegewebe, das sich lamellär verdichtet und den Knorpel als Perichondrium umgibt.

Aus den Mesenchymzellen entstehen die Chondroblasten, die Knorpelgrundsubstanz ausscheiden. Diese besteht zu 70 % aus Wasser, aus Glykosaminoglykanen sowie aus kollagenen oder elastischen Fasern. Durch die Neubildung der Knorpelmatrix rücken die Zellen auseinander. Mit zunehmendem Wachstum differenzieren sich die Chondroblasten zu den reifen Knorpelzellen, den Chondrozyten (Liebich et al. 1990).

3.1.1 Hyaliner Knorpel

Der hyaline Knorpel ist ein hypozelluläres, avaskuläres, aneurales und alymphatisches Gewebe, das die artikulierenden Knochenenden eines synovialen Gelenkes überzieht. Er ist das im Körper am häufigsten vorkommende Knorpelgewebe und bildet z.B. die Gelenkknorpel, die Rippenknorpel, die knorpelige Vorstufe des embryonalen Stützskeletts, die Nasenknorpel oder die Knorpel der Atemwege.

Hyaliner Knorpel besteht aus Chondrozyten und einer inhomogenen anisotropen extrazellulären Matrix, welche vorwiegend aus Kollagenfasern und Proteoglykanen besteht (Kiviranta et al. 2006). Das Verhältnis der Matrixkomponenten zueinander bestimmt die viskoelastischen Eigenschaften des Gewebes und ermöglicht die Absorption der einwirkenden Kräfte. Zu den besonderen mechanischen Eigenschaften des hyalinen Knorpels gehört seine Druckfestigkeit sowie ein bestimmtes Maß an Druckelastizität (Liebich et al. 1990). Die Elastizität der extrazellulären Knorpelmatrix ist als so genannte „Knorpelsteifigkeit“ definiert (Korhonen et al. 2002).

3.1.2 Faserknorpel

Faserknorpel ist eine sehr kompakte, stabile Knorpelart, die sich aus straffem Bindegewebe entwickelt. Diese Knorpelart stellt ein Strukturelement der Bandscheiben (Disci intervertebrales) sowie der Menisken dar und ist Bestandteil der Beckensymphyse. Er kann

außerdem in den Gelenkbändern oder Sehnen (*M. biceps brachii* des Pferdes) anzutreffen sein und sich an bestimmten Stellen aus hyalinem Knorpel entwickeln.

Im histologischen Bild dominieren stark verflochtene kollagene Faserbündel, die in Richtung der Hauptbelastung des Gewebes angeordnet sind. Chondrozyten kommen weitaus spärlicher vor als bei den anderen Knorpelarten. Sie liegen vorwiegend einzeln und in großen Abständen von ihren Nachbarzellen. Knorpelgrundsubstanz ist nur in geringer Menge vorhanden und besonders in der Umgebung der Knorpelzellen konzentriert, wo sie wenige Kollagenfasern maskieren kann (Liebich et al. 1990).

3.1.3 Elastischer Knorpel

Elastischer Knorpel, der in der Ohrmuschel, Kehldeckel und Teilen des äußeren Gehörgangs vorkommt, enthält neben feinen maskierten Kollagenfasern elastische Fasern, die als reichverzweigtes Netzwerk die Knorpelmatrix durchziehen. Der Knorpel erhält aufgrund Ihrer physikalisch – optischen Eigenschaften eine gelbliche Farbe.

Trotz zunehmenden Alters verknöchert der elastische Knorpel nicht. Die elastischen Fasern bedingen seine starke Biogsamkeit (Liebich et al. 1990).

3.2 Osteoarthrose

Osteoarthrose ist eine degenerative Gelenkerkrankung, bei der es zu fortschreitender Zerstörung des hyalinen Gelenkknorpels kommt, begleitet von Veränderungen im Bereich der subchondralen Knochenplatte. Weitere Strukturen wie die Synovialkapsel, die Synovialmembran sowie die Menisken sind ebenfalls betroffen (Aigner und Söder 2008).

Die ersten makroskopisch sichtbaren osteoarthrotischen Veränderungen des Gelenkknorpels sind Gelbfärbung sowie Glanzverlust (Aigner und Söder 2008). Darüber hinaus kommt es zur Knorpelerweichung und Rissbildungen sowie zu sichtbarem Matrix- und Substanzverlust, insbesondere in den Hauptbelastungszonen. Bei einem völligen Verlust der Knorpelschicht wird schließlich der subchondrale Knochen sichtbar („Knochenglatze“). Typischerweise finden sich im peripheren Bereich der Gelenkflächen osteophytäre Zubildungen sowie

subchondrale Sklerosierungen im angrenzenden Knochen. Im weiteren Verlauf können am Knochen Nekroseareale sowie so genannte „Geröllzysten“ auftreten.

Synovialitis und Gelenkerguss können die Erkrankung begleiten.

Frühe degenerative Veränderungen der Feinstruktur des Gelenkknorpels sind außerdem die unregelmäßige Anordnung der Kollagenfibrillen in der oberflächlichen und mittleren Knorpelschicht sowie Veränderungen in der Proteoglykanmolekularstruktur. Diese initialen Veränderungen führen zu einem verminderten Quellungsdruck sowie zu einer verstärkten Wassereinlagerung in das Knorpelgewebe. Daraus resultiert eine Erweichung des Knorpels sowie eine Abnahme der Knorpelsteifigkeit.

Das Kollagennetzwerk wird zerstört, mikroskopisch sind nach Aigner und Söder (2008) Rissbildungen sowie eine unregelmäßige Kontur der Knorpeloberfläche („Knorpelulser“) bis hin zum Fehlen der gesamten Knorpelschicht sichtbar. Feststellbar ist außerdem ein verminderter Gehalt der kleinen Proteoglykane in der obersten Knorpelzone, ausgelöst durch aus Chondrozyten stammenden Matrixmetalloproteinasen. Gleichzeitig findet in den tieferen Knorpelschichten eine verstärkte Synthese der Proteoglykane statt (Franz et al. 2000).

Die ortsständigen Chondrozyten reagieren auf die progressive Knorpeldestruktion mit einer gesteigerten Zellproliferation, der so genannten Clusterbildung. Lichtmikroskopisch sind typische Knorpelnester sichtbar (Aigner und Söder 2008).

Eine entscheidende Rolle bei der progressiven Osteoarthritis spielen inflammatorische Zytokine. Erhöhte Konzentrationen von beispielsweise Interleukin-1 werden vorwiegend in der Synovia von Patienten mit Osteoarthritis und auch rheumatoider Arthritis gefunden.

Im weiteren Verlauf kommt es zum apoptotischen Zelltod von Chondrozyten, bei deren Lyse vermehrt intrazelluläre Proteasen freigesetzt werden.

Ein gängiges Punktesystem zur Beurteilung der Knorpelbeschaffenheit bei Osteoarthrose ist das von Mankin et al. (1971) verfasste Histologic/Histochemical Grading System (HHGS). Basierend auf den Kombinationen von zellulären Veränderungen, der Anfärbbarkeit der knorpeligen Matrixbestandteile sowie strukturellen Veränderungen des Knorpels erfolgt die Gradeinteilung der Osteoarthrose anhand eines 14 Punkteschemas (Tab. 1).

I Struktur	
A Normal	0
B unregelmäßige Oberfläche	1
C Pannusbildung und unregelmäßige Oberfläche	2
D oberflächliche Einrisse	3
E tiefe Einrisse	4
F Einrisse des kalzifizierten Knorpels	5
G völlige Zerstörung des Knorpels	6
II Zellen	
A Normal	0
B erhöhte Zelldichte	1
C Clusterbildung	2
D verminderter Zellgehalt	3
III Safranin O Färbung	
A Normal	0
B ggr. Kontrast	1
C mgr. Kontrast	2
D starker Kontrast	3
E keine Färbung sichtbar	4
IV Integrität der Tidemark	
A Intakt	0
B mit Blutgefäßen durchsetzt	1
Punkte insgesamt	
Minimal	0
Maximal	14

Tab. 1: Histologisches/Histochemisches Beurteilungsschema zur Knorpelbeschaffenheit bei Osteoarthrose (HHGS) beschrieben durch Mankin et al. (1971)

Im Jahre 2007 wurde dieses System durch das Osteoarthritis Cartilage Histopathology Assessment System (OARSI) erweitert. Nach Aussagen von Custers et al. (2007) sei dieses Bewertungsschema zuverlässiger (Tab. 2).

Makroskopisch kann die Knorpeloberfläche anhand eines Arthroseschemas, dem so genannten *Collins-Grade* (Collins et al. 1949) beurteilt werden. Dieses Screeningverfahren ermöglicht eine makroskopische Einteilung der Knorpeloberfläche in 4 Stadien (Tab. 3).

Hauptbefunde	Nebenbefunde	Gewebereaktion
Grad 0 Knorpeloberfläche intakt	keine	keine
Grad 1 Knorpeloberfläche unverändert	1.0 Zellen intakt 1.5 Zelldetritus	Matrix: oberflächliche Auffaserung und Ödembildung Clusterbildung, Zellhypertrophy
Grad 2 oberflächliche Zusammenhangstrennung	2.0 oberflächliche Auffaserung 2.5 oberflächliche Furchenbildung	s. oben oberflächliche Zusammenhangstrennung, ggr Kontrast (Safranin o oder Toluidinblau), mehr als 1/3 des Knorpels ist bis zur mittleren Schicht anfärbbar, unregelmäßig geformte Chondrone
Grad 3 tiefe Furchenbildung	3.0 Einrisse/Spaltbildung 3.5 Gruben/Furchenbildung	s. oben ggr Kontrast (Safranin O oder Toluidinblau), Knorpel ist bis zu den untersten 2/3 der tiefen Schicht anfärbbar, neue Anordnung des Kollagens (polarisierter Lichtmikroskopie, Picro Sirius Red Färbung)
Grad 4 Knorpelerosion	4.0 Verlust der oberflächlichen Schicht 4.5 die mittlere Schicht ist betroffen	Substanzverlust, Zystenbildung
Grad 5 Freiliegen der subchondralen Knochenplatte	5.0 subchondrale Knochenplatte intakt 5.5 reparative Umbauprozesse auf der subchondralen Knochenplatte sichtbar	Sklerosierung der subchondralen Knochenplatte, Faserknorpelbildung
Grad 6 Verformung	6.0 peripher Osteophytenbildung 6.5 periphere und zentrale Osteophytenbildung	Remodelling, Verformung der subchondralen Knochenplatte Mikrofrakturen, Reparationsvorgänge

Tab. 2: Histopathologisches Beurteilungsschema zum Gelenkknorpel bei Osteoarthritis (OARSI) nach Custers et al. 2007

Collins Grade
(Collins_Grade.doc)

Grade	Beschreibung
0	Keine Veränderungen
1	Leichte Veränderungen der Knorpeloberfläche: - oberflächliche, leichte Auffaserung - oberflächliche, leichte Spaltbildungen bzw. Einrisse - leichte Furchenbildung
2	Beginnende Zerstörung des Knorpels: - tiefe Auffaserungen - tiefe Spaltbildungen bzw. Einrisse - tiefe Gruben bzw. Furchenbildung (Gratbildung) - kleine Osteophyten möglich
3	Hochgradige Zerstörung des Knorpels: - weniger als 30% des Knorpels bis zur subchondralen Platte erodiert - ausgeprägte Auffaserungen - ausgeprägte Spaltbildungen bzw. Einrisse - Osteophytenbildung vorhanden
4	Völlige Zerstörung des Knorpels: - mehr als 30% des Knorpels bis zur subchondralen Platte erodiert

Tab. 3: Arthroseschema und Gradeinteilung nach Collins (Collins et al. 1949)

3.2.1 Osteoarthritis oder Osteoarthrose ?

Eine Arthrose ist eine degenerative Gelenkerkrankung, die mit reaktiven Veränderungen an Knochen (Pseudozysten, Hyperostosen, Exostosen) und Gelenkkapselgewebe (Synovialitis, Fibrose) einhergeht. Im Verlauf einer Arthrose kommt es zur reaktiven Synovialitis. Ausgangspunkt sind Knorpel- und Knochensequester, die einen Entzündungsprozess induzieren, der mit einer gesteigerten Fibrinexsudation einhergeht (Litzke 2004).

Eine Gelenkentzündung wird als Arthritis bezeichnet. Die primäre Entzündung ist auf das Stratum synoviale lokalisiert (Synovialitis). Die daraus resultierenden Veränderungen führen zu Ernährungsstörungen der Chondrozyten und zu einer Schädigung des Gelenkknorpels. Ist zusätzlich das Stratum fibrosum in das Entzündungsgeschehen involviert, spricht man von einer Panarthritis. Bei einer Osteoarthritis sind die benachbarten Knochen beteiligt. Aus jeder Arthritis kann eine Arthrose entstehen (Litzke 2004).

Erstmalig tritt die Bezeichnung Osteochondritis dissecans im Jahre 1888 auf, initiiert durch den Humanmediziner König. Er beschreibt diesen Begriff als pathologisches Geschehen im Bereich des Epiphysenknorpels mit Prädisposition zu freien Gelenkkörpern bei jungen Individuen ohne vorher bekanntes Trauma oder vorher diagnostizierter primärer Arthritis.

In der Tiermedizin sind die Begriffe Osteochondritis und Osteochondrose bis zum Jahre 1960 nicht beschrieben.

Der modernen Literatur nach (Rolauffs et al. 2002) wird der „Osteoarthritis – Knorpel“ als ein entzündungsfähiges Gewebe betrachtet. Da Knorpel avaskulär, aneural und alymphatisch ist, kann er aber nicht die klassischen Kardinalsymptome der Entzündung „Rubor, Tumor, Calor, Dolor und Functio laesa“ zeigen. Demzufolge führt die Osteoarthritis zu einer biomechanischen Erkrankung des Knorpels mit kurzer episodischer Entzündung.

Basiert die Definition der Entzündung nach Rolauffs et al. 2002 auf molekularer Ebene, dann wird die Osteoarthrose zur Osteoarthritis. Chondrozyten und aktivierte Makrophagen besitzen die Gemeinsamkeit, Entzündungsmediatoren zu sezernieren.

Das heißt also, Chondrozyten übernehmen im Falle einer Knorpeldestruktion die Rolle als aktivierte Makrophagen. Geschädigter Knorpel stellt ein Gewebe dar, das durchaus entzündungsfähig ist, nicht aber die klassische Definition der Entzündung erfüllt.

In der Terminologie haben sich die Sammelbezeichnungen Osteoarthritis, Osteoarthrose, degenerative Gelenkerkrankungen, Arthropathia deformans, Arthrosis deformans, Arthropathie durchgesetzt (Dämmrich et al. 1978).

Da es durch Knorpelabrieb und Zelldetritus zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren und somit sekundär zu einem reaktiven Entzündungsgeschehen kommt, ist in der englischsprachigen Literatur der Ausdruck Osteoarthritis gebräuchlich. Er wird auch in der deutschsprachigen Literatur weitgehend übernommen (Heisel und Mittelmeier 1992).

3.2.2 Die equine Osteochondrosis dissecans (OCD):

Bei der OCD handelt es sich um ein idiopathisch abgetrenntes subchondrales Knochenfragment mit darüberliegendem Knorpel. Diese Erkrankung beginnt im Wachstumsalter, wenn der Epiphysenfugenschluss erfolgt. Bei Pferden wird die Osteochondrose häufig am Femoropatellargelenk, am Tarsalgelenk und am Fesselgelenk angetroffen (Litzke 2004).

Im juvenilen Alter ist der Anschluss an das diaphysäre Gefäßnetz unzureichend. Der gelenknahe Knochen reagiert empfindlich gegenüber traumatischen Einflüssen. Folglich entsteht eine verminderte Durchblutung im betroffenen Knorpel-Knochen-Bereich. Löst sich dieses Knorpel-Knochenareal ab, so bezeichnet man dies als freien Gelenkkörper (Corpus liberum, Gelenkmaus). Die Entstehung einer OCD wurde ebenfalls mit einem zu schnellen Wachstum und einer zeitgleich extrem hohen Energieaufnahme über das Futter in Verbindung gebracht. Studien über erbliche Veranlagungen haben gezeigt, dass genetische Faktoren bis zu 25-50 % als Basisfaktor für die Ausprägung einer OCD am Sprunggelenk verantwortlich sind (Martens und DeMoor 2006).

Die OCD geht häufig mit einer vermehrten Gelenkfüllung einher. Der freie Gelenkkörper kann eine Gelenkblockierung mit hochgradiger akuter Lahmheit hervorrufen und zu schweren arthrotischen Veränderungen führen (Litzke 2004). Bei der röntgenologischen Untersuchung sind vorwiegend subchondrale Defekte im Bereich des lateralen Trochleakammes zu sehen, aber auch der mediale Trochleakamm sowie die Patella können betroffen sein (McIlwraight et al. 2005). Gerade der laterale Trochleakamm des distalen Femur wird häufig als Prädilektionsstelle der equinen OCD diskutiert. Frisbie et al. (2006) nennt außerdem noch den medialen Femurkondylus sowie die beidseitigen Trochleakämme als häufig betroffene Areale der Osteochondrosis dissecans im Kniegelenk des Pferdes.

Ist die Lahmheit durch konservative Therapie nicht innerhalb von 4-6 Wochen zu beheben, ist die chirurgische Entfernung der Knorpelschuppe mittels Arthroskopie bzw. Arthrotomie angezeigt. Die Entstehung einer Arthrosis deformans soll verhindert werden.

Postoperativ können nichtsteroidale Antiphlogistika, Hyaluronsäure und Glykosaminoglykane die Heilung fördern (Litzke 2004).

Nach Lecoq et al. (2008) sind in den meisten Gelenken histologisch bereits in der Fetalperiode (6-9 Monate alte Feten) Veränderungen wie Hypozellularität, nekrotische Chondrozyten und verminderte Anfärbbarkeit der Proteoglykane in der extrazellulären Knorpelmatrix nachweisbar. Dies lässt vermuten, dass es sich hierbei um die ersten Schwachpunkte handelt, die zur Osteochondrose führen könnten. Interessant ist jedoch, dass in dieser Studie ältere Feten (10-11 Monate) und neugeborene Fohlen (8 Tage post partum) signifikant weniger Veränderungen aufwiesen. Folglich könnte es sich bei den Veränderungen in der extrazellulären Matrix um physiologische Entwicklungsprozesse handeln.

Die Struktur des Kollagens im Bereich der wachsenden Epiphyse ist während der Fetalperiode variabel. Während des Differenzierungsprozesses, in dem das Kollagen seine biomechanischen Eigenschaften erfährt, sei es nach Lecoq et al. (2008) für Defekte empfänglich.

Olstad et al. (2008) untersuchten in ihrer Studie die Entwicklung der Blutversorgung von Epiphysenknorpel am distalen Femur bei Fohlen. Während der Fetalperiode setzt sich der Epiphysenbereich aus hyalinem Knorpel und einem Netzwerk aus Blutgefäßen zusammen. Diese verlaufen in Knorpelkanälchen.

Es konnte gezeigt werden, dass diese fetalen Blutgefäße noch bei neugeborenen Fohlen vor allem im Bereich des Femoropatellar- und des Femorotibialgelenkes vorhanden sind. Bisher ist aus der Literatur bekannt, dass eine vollständige Avaskularität des Gelenkknorpels erst ab einem Alter von 7 Monaten vorhanden ist (Olstad et al. 2008).

Während der enchondralen Ossifikation werden die Blutgefäße durch die so genannten Ossifikationszentren inkorporiert. Um die Blutversorgung des Knorpels aufrecht zu erhalten, müssten diese erst wieder durchquert werden. Die Arbeitsgruppe um Olstad vermutet hier den Ansatzpunkt für frühe Läsionen der equinen Osteochondrose.

3.3 Chondrozyten des hyalinen Knorpels:

Die Chondrozyten sind in der Knorpelmatrix eingebettet, sie liegen in Knorpelhöhlen, den so genannten Lakunen. Die Wand einer Lakune bezeichnet man als Knorpelkapsel.

Chondrozyten mit Knorpelkapsel und angrenzender Interzellulärschicht werden als bedeutende Funktionseinheit des Knorpelgewebes (Chondrone) zusammengefasst (Liebich et al. 1990).

Hyaliner Knorpel ist gefäßlos und wird nicht innerviert. Die Ernährung der Knorpelzellen erfolgt durch Diffusion und Konvektion der Synovia, welche durch in der Gelenkkapsel lokalisierte Synoviozyten produziert wird (Liebich et al. 1990). Die Chondrozyten sind postmitotisch und können bei Destruktion meistens nicht ersetzt werden.

Die höchste Zelldichte des hyalinen Knorpels befindet sich in der superfiziellen Schicht des Gelenkknorpels. Zunehmend weniger Chondrozyten sind in der Tiefe lokalisiert (Kuettner et al. 1999). Scheinbar ist die Zelldichte der superfiziellen Schicht abhängig von der anatomischen Lokalisation und der biomechanischen Eigenschaft des Gelenkes (Rolauffs et al. 2002).

3.4 Aufbau und Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM)

Die biomechanischen Eigenschaften des hyalinen Gelenkknorpels beruhen auf der spezifischen Zusammensetzung der extrazellulären Knorpelmatrix, die ca. 95 % Gesamtvolumen des Gelenkknorpels ausmacht.

Die ECM wird durch die Chondrozyten synthetisiert und durch diesen Prozess kontinuierlich erneuert. Innerhalb des Chondrons befindet sich ein hoher Gehalt an Proteoglykanen und weiteren Matrixmolekülen, die durch Rezeptoren sowie durch zytoplasmatische und mikrofilamentreiche Ausläufer die Knorpelzelle mit der kapsulären Matrix verbinden (Knudson und Loeser 2002). Diese setzt sich aus fibrillären Kollagenfasern zusammen und bildet die Grenze des Chondrons.

Das Chondron wird von der interterritorialen Matrix umgeben. Sie bildet mengenmäßig den größten Anteil der ECM und besteht aus einem dreidimensionalen Netzwerk von Kollagenfibrillen, Proteoglykanen und Glykoproteinen (Poole et al. 1986).

Der humane Gelenkknorpel enthält beim Erwachsenen fast 70 % Wasser, sowohl in freier als auch in molekular gebundener Form. Nähere Literaturangaben zur Knorpelzusammensetzung beim Pferd liegen bislang nicht vor.

Kollagen Typ II und das Hauptproteoglykan Aggrecan sind knorpelspezifische Marker, die von einem bestimmten zellulären Phänotyp synthetisiert werden (Little et al. 1996).

3.4.1 Kollagen

Unter dem Aspekt der Stabilität bzw. der potentiellen Schwachstellen des Gelenkknorpels ist eine detaillierte Darstellung der molekularen Verhältnisse angezeigt.

Das dreidimensional angeordnete Kollagennetzwerk zeichnet sich besonders durch die hohe Reißfestigkeit und die geringe Dehnungsfähigkeit von nur etwa 5 % aus (Otte et al. 2000). Es ermöglicht dem Knorpel daher ein hohes Maß an Druckelastizität. Das eigentliche Wirkungsprinzip des Kollagenfasernetzes ist die Aggregation von einzelnen Fibrillen zur Tripelhelix. Mittels polarisierter Lichtmikroskopie ist die Anordnung der Kollagenfasern aufgrund ihrer Querstreifung darstellbar (Nieminen et al. 2001, Nissi et al. 2006, Julkunen et al. 2008). Es handelt sich dabei um ein gängiges Nachweisverfahren für Kollagen.

Nach Rolauffs et al. (2002) ist die arkadenähnliche Formation der Kollagenfibrillen im Gelenkknorpel entscheidend für die biomechanische Funktion des Gewebes. Ausgehend vom subchondralen Knochen ziehen die Kollagenfibrillen senkrecht in Richtung Knorpeloberfläche. Im Bereich der Knorpeloberfläche ist der Faserverlauf tangential (Abb. 10). Nach Benninghoff (1925) wird der humane Gelenkknorpel aufgrund dieser Struktur des Kollagennetzwerkes in drei klassische Schichten eingeteilt (oberflächliche, mittlere und tiefe Zone).

Literaturangaben zufolge sind bei zahlreichen Haustierarten (Rind, Pferd, Ziege, Hund, Kaninchen) weitere Schichten im Bereich der tiefen Zone beschrieben (Nieminen et al. 2001, Kiviranta et al. 2006, Nissi et al. 2006, Hyttinen et al. 2009, Julkunen et al. 2008, 2009) definieren diese Anordnung als multilaminares Kollagennetzwerk. Je komplexer die Kollagenfasern in einer Knorpelschicht angeordnet sind, umso höher ist die Knorpelsteifigkeit in diesem Bereich, umso geringer die Permeabilität und umso dehnbarer die horizontal ausgerichteten Kollagenfasern. Diejenigen Kollagenfibrillen, die im Bereich der tiefen Zone

parallel zur Knorpeloberfläche verlaufen, sind nach Julkunen et al. (2008) besonders dehnbar und reißfest.

Beim Kaninchen nimmt der Kollagengehalt im Femoropatellargelenk nach Julkunen et al. (2009) bis zu einem Alter von 3 Monaten zu. Während dieser Reifungsphase verlaufen die Kollagenfasern in der tiefen Knorpelzone zunächst parallel. Nach 3 Monaten post partum sind diese Fasern senkrecht zur Oberfläche des Gelenkknorpels ausgerichtet. Während dieser Zeit reduziert sich die Knorpeldicke von 3 mm auf 0,5 mm. Ab dieser Entwicklungsphase entwickelt sich die subchondrale Knochenplatte.

Kiviranta et al. (2006) begründet diese extralaminare Schichtung des Kollagens mit unvollständigen Reifungsprozessen im Knorpel. Obwohl Tiere ausgewachsen sind und ihre maximale Körpermasse erreicht haben, sind in einigen Gelenkabschnitten, wie beispielsweise im Patellarbereich noch Reifungsprozesse vorhanden.

Der hyaline Knorpel beinhaltet hauptsächlich Kollagenfibrillen vom Typ II, die Kollagentypen VI, IX, X und XI sind mit 1-3 % nur geringfügig vorhanden.

Der höchste Kollagengehalt wird nach Kiviranta et al. (2006) am Übergang zum subchondralen Knochen gemessen. Der Femurkondylus hat die stärkste Kollagensynthese im Bereich der tiefen Zone des Gelenkknorpels. Dieser Abschnitt im Kniegelenk ist Literaturangaben zufolge starken Belastungen ausgesetzt.

- Fibrogenese :

Bei der Faserbildung, der so genannten Fibrogenese wird zwischen einer intrazellulären und extrazellulären Bildungsphase unterschieden (Prockop et al. 1982, Petit et al. 1992, Otte et al. 2000, Deutzmann et al. 2003).

1. intrazelluläre Phase:

In diesem Abschnitt der Fibrogenese entsteht das Prokollagen als Polypeptidvorstufe des Kollagens. An den Ribosomen des rauhen endoplasmatischen Retikulums werden die so genannten Pro-Alpha-Ketten synthetisiert. Diese bestehen vorwiegend aus den Aminosäuren Alanin, Glyzin und Prolin. Im endoplasmatischen Retikulum erfolgt nach Hydroxylierung von Prolin und Lysinresten die helikale Verbindung von jeweils 3 Ketten (Tripelhelix). Im Golgi-

Apparat erfolgt die Inkorporation von Galaktosyl- und Glukosylresten, anschließend wird das fertige Prokollagenmolekül in Bläschen eingehüllt entlang von Mikrotubuli zur Zelloberfläche und von dort mittels Exozytose in den extrazellulären Raum abgegeben.

Gemeinsames Strukturmerkmal aller Kollagene ist das Vorkommen von stabförmigen Abschnitten, die eine tripelhelikale Konformation besitzen. Drei linksgängige Stränge bilden eine rechtsgängige Superhelix aus. Diese Konformation ist durch stets wiederholte Triplet-Sequenzen aus Gly-X-Y bedingt, wobei X und Y häufig Prolin und Hydroxyprolin sind. Prolin (X) fungiert hier aufgrund seiner starren Ringstruktur als „Ecke“ in der Polypeptidkette und unterstützt die Ausbildung von engen Windungen innerhalb der Tripelhelix. 4 - Hydroxyprolin ist überwiegend an Position Y lokalisiert und stabilisiert die Tripelhelix über Wasserstoffbrücken zwischen benachbarten Polypeptidketten. Durch die Verwendung von Glyzin, Prolin und Hydroxyprolin sind enge Raumbedingungen innerhalb der Tripelhelix möglich, zusätzlich wird die Rotation der Polypeptidkette begrenzt.

Die Besetzung jeder dritten Position mit Glyzin ist erforderlich, weil jeder dritte Rest einer Kollagenkette durch das Zentrum der Helix geht und nur die kleinste Aminosäure Glyzin hier Platz findet (Abb. 5).

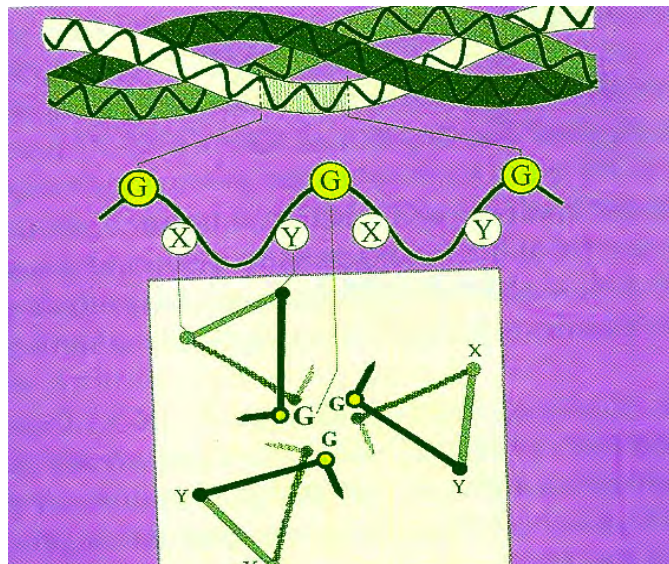


Abb. 5: Alpha-Ketten mit geregelter Aminosäuresequenz (Glyzin an jeder dritten Stelle)

Im Rahmen: die dreidimensionale Darstellung der Anordnung zur Tripelhelix (nach Petit et al. 1992)

2. extrazelluläre Phase:

Im Extrazellularraum erfolgt durch die Prokollagenpeptidase enzymatisch die Bildung einer verkürzten Tripelhelix, das so genannte Tropokollagen. Dieses verbindet sich mit dem jeweiligen Ende zu Ketten, den Mikrofibrillen (Abb. 6).

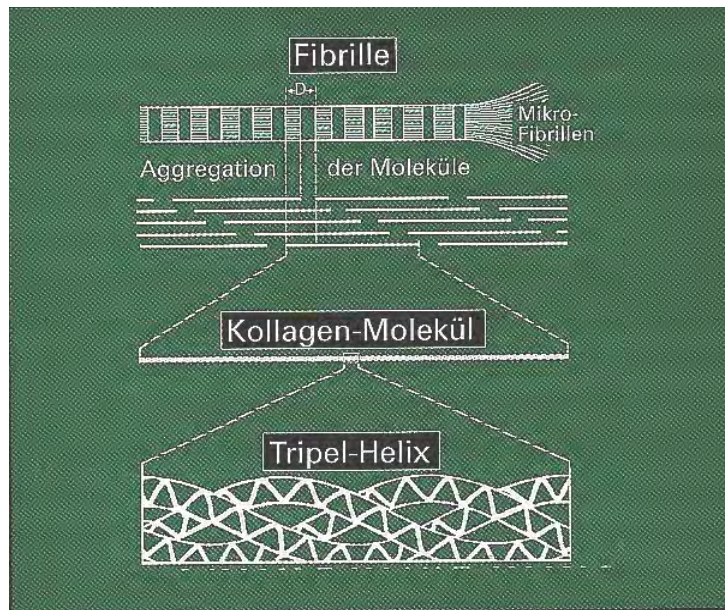


Abb. 6: Die Stufen beim Aufbau von der Tripelhelix zur Fibrille (nach Prockop et al. 1982)

- von Mikrofibrille zur Fibrille

Ursächlich wird für die Entstehung der Mikrofibrillen die elektrostatische Anziehung benachbarter Tropokollagene angenommen. Diese führt zu einer versetzten Zusammenlagerung des Tropokollagens um einheitlich 300 μm . Elektronenoptisch erscheint dies als Querstreifung der Mikrofibrille. Die Summe aus mehreren parallel assoziierten Mikrofibrillen ergibt eine einzelne Fibrille. Die Aneinanderlagerung erfolgt dabei stets regelmäßig und periodisch. Über intermolekulare Crosslinks werden die Kollagenfibrillen stabilisiert (Otte et al. 2000).

Die Verkettung der Moleküle im Fibrillenverband ist überwiegend verantwortlich für die physikalischen Eigenschaften der Kollagenfasern. Nach Prockop et al. (1982) hält eine einzelne Kollagenfaser von einem Millimeter Durchmesser Zugbelastungen zwischen 10 und 40 Kilogramm aus.

Das dreidimensionale Kollagenetzwerk wird stabilisiert durch Wasserstoffbrückenbindungen, intramolekularen Crosslinks und den so genannten kleinen Kollagenen (Kollagene vom Typ IX und XI).

Die einzelnen Kollagentypen unterscheiden sich in der Länge der tripelhelikalen Abschnitte, kurzen Unterbrechungen in der Tripelhelix und in dem zusätzlichen Vorhandensein von globulären Domänen. Dadurch erhalten die Kollagene unterschiedliche biologische Eigenschaften (Deutzmann et al. 2003).

Nach Stegemann und Stalder (1967) lässt sich der Kollagengehalt in einer Probe sehr genau anhand der Menge der Aminosäure Hydroxyprolin bestimmen. Diese Aminosäure wird während der Kollagensynthese durch Hydroxylierung der Aminosäure Prolin gebildet und kommt spezifisch nur in Kollagenen vor.

Nach Appleyard et al. (2003) sowie Temple-Wong et al. (2009) beträgt der Hydroxyprolinanteil 13,5 % des Kollagengehaltes im hyalinen Gelenkknorpel.

3.4.2 Proteoglykane:

Die extrazelluläre Matrix enthält zusätzlich zum Kollagen die Proteoglykane, eine heterogene Gruppe von Proteinen, die mit Glykosaminoglykanketten substituiert sind. Nach Otte et al. (2000) besitzen die Glykosaminoglykane (GAG) aufgrund von sulfatierten Zuckern und Uronsäuren stark negative Ladungen. Ca. 50 – 100 Glykosaminoglykanketten sind nach einem Flaschenbürstenmuster an ein Protein gebunden und bilden ein Proteoglykan – Monomer (Abb. 7).

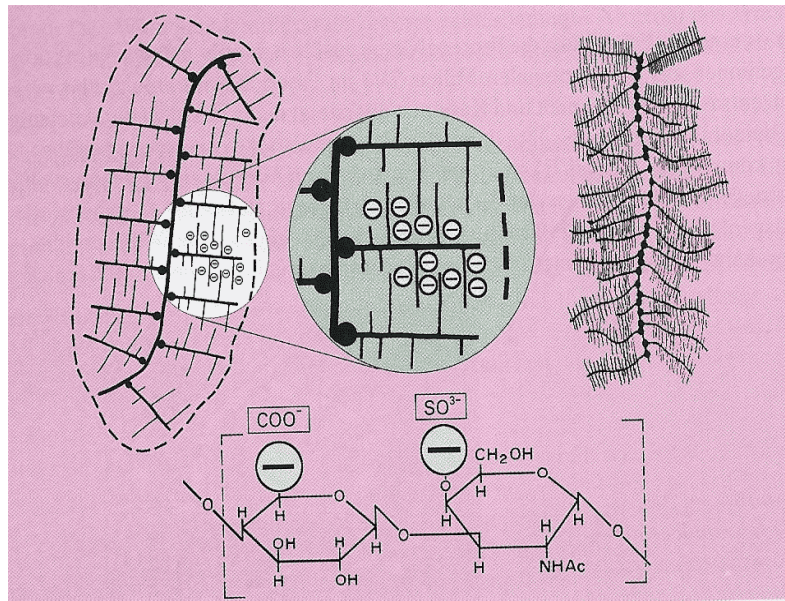


Abb. 7: Proteoglykan-Aufbau als Polyanion und Position der negativen Ladungen auf dem Proteoglykan-Monomer (aus Otte et al. 2000)

Durch die Proteoglykane erhält der Knorpel seine viskoelastischen Eigenschaften. Sie werden vor allem bestimmt durch den Grad der Wasseraufnahme bzw. Wasserabgabe unter unterschiedlichen Druckbelastungen (Rolauffs et al. 2002).

Eingebettet in das Kollagengerüst (Abb. 8) liegen sie im Knorpel in komprimierter, teilweise in hydrierter Form vor. Ihre Halbwertszeit beträgt 1-2 Jahre. Nach Kiviranta et al. (2006) liegen die meisten Proteoglykane im Bereich der tiefen Schicht des Gelenkknorpels.

Der Hauptproteoglykantyp des Gelenkknorpels ist das *Aggrecan*. In der extrazellulären Matrix bildet *Aggrecan* riesige Komplexe mit Hyaluronsäure, die selbst ein großes lineares Polymer aus bis zu 25 000 Disaccharideinheiten von Glucuronsäure und N-Acetyl-Glucosamin darstellt. Die nichtkovalente Bindung wird durch die N-terminale globuläre Domäne des Aggrecans vermittelt und durch ein kleines Linkprotein stabilisiert.

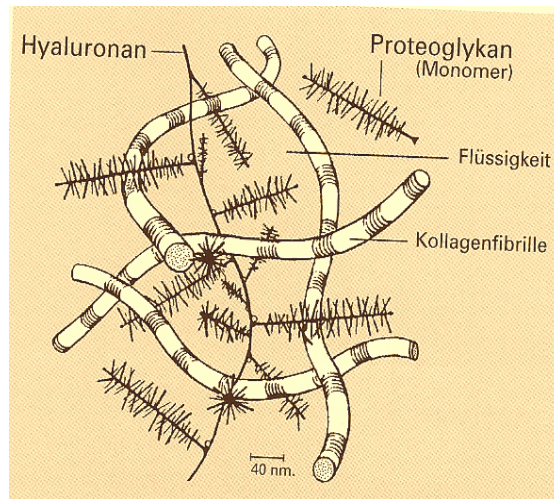


Abb. 8: Proteoglykan – Aggregate im Netzwerk der Kollagenfasern (nach Mow et al. 1992)

Der Gelenkknorpel enthält kleine Proteoglykane, deren Coreproteine durch leucinreiche Sequenzen gekennzeichnet sind (Little et al. 1996). Biglycan und Decorin werden zusammengefasst als Dermatansulfatproteoglykane bezeichnet, Fibromodulin gehört in die Gruppe der Keratansulfatproteoglykane.

Nach Little et al. (1996) modulieren Biglycan und Decorin die Zelladhäsion, Zellreplikation und die Kollagenfibrillenbildung. Vor allem Decorin ist nach Appleyard et al. (2003) verantwortlich für starke Interaktionen zwischen den Kollagenfasern vom Typ II.

In der Studie von Hyttinen et al. (2009) konnte gezeigt werden, dass beim Pferd die Proteoglykanverteilung innerhalb eines Gelenkes altersabhängig ist. Unmittelbar nach der Geburt ist der Proteoglykangehalt im Randbereich des Metakarpalgelenkes am höchsten. Bei ausgewachsenen Pferden hingegen sind die meisten Proteoglykane im Zentrum des Gelenkes lokalisiert.

3.5 Die vier Schichten des hyalinen Knorpels (Abb. 9)

1. **Die superfizielle Schicht oder Tangentialschicht:** Sie besteht hauptsächlich aus dicht gepackten und tangential zur Oberfläche orientierten Typ-II-Kollagenfibrillen (Abb. 10). Sie weist einen relativ geringen Proteoglykangehalt auf und hat eine sehr geringe Permeabilität. Aufgrund dieser Eigenschaften kann sie Druck- und Zugbelastungen widerstehen. Gleichzeitig verhindert sie als Schutzbarriere, dass interstitielle Flüssigkeit und freie Ionen in die Gelenkhöhle verloren gehen. In humanem adulten Knorpel misst sie 100 µm Dicke (Rolauffs et al. 2002). Die Chondrozyten sind in dieser Schicht flach oder eiförmig.
2. **Intermediärzone:** In der mittleren Schicht nimmt der Proteoglykangehalt zu, die Kollagenfibrillen werden größer und sind willkürlicher verteilt. Die Chondrozyten liegen vereinzelt oder paarweise vor.
3. **Tiefe (Radial-)Zone:** Die meisten Kollagenfasern sind in der tiefen Zone des Gelenkknorpels lokalisiert. Sie enthält den höchsten Gehalt an Proteoglykanen. Die Chondrozyten sind rundlich geformt und in isogenen Gruppen organisiert, welche säulenartige Formationen bilden.
4. **Zone des mineralisierten Knorpels:** Vom subchondralen Knochen ausgehend verlaufen die Kollagenfasern senkrecht zur Knorpeloberfläche (Abb. 10). Durch die Tidemark im Bereich der tiefen Schicht wird der nicht kalzifizierte Knorpel vom kalzifizierten Bereich getrennt. Dieser geht in den subchondralen Knochen über.

Knorpelaufbau:

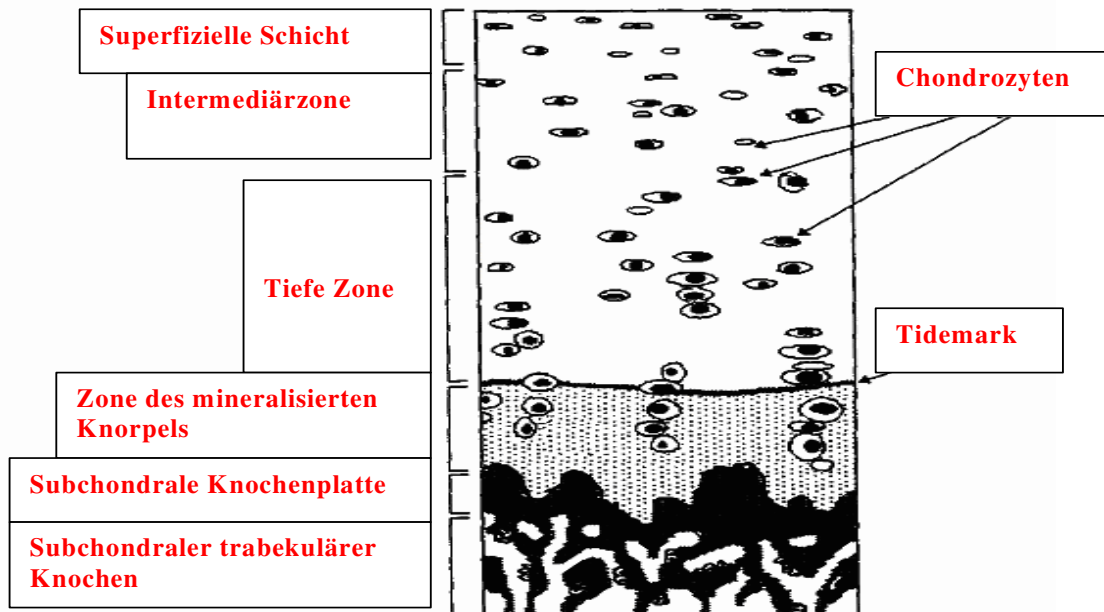
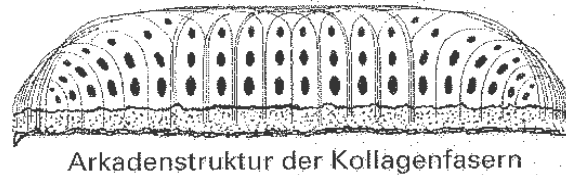


Abb. 9: Knorpelaufbau (nach Lyrra et al. 1997)

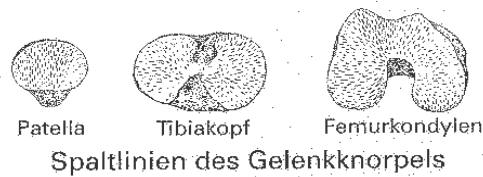
4. Die Biomechanik des Gelenkknorpels

Nach Rolauuffs et al. (2002) machen die Chondrozyten etwa 1-10 % des gesamten Knorpelvolumens aus, der restliche Anteil setzt sich aus extrazellulärer Matrix und interstitieller Flüssigkeit zusammen. Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix (ECM) sind die Kollagenfibrillen vom Typ II sowie die Proteoglykane mit ihren Glykosaminoglykanseitenketten (GAG).

Kummer (1980) bestätigte in seiner Studie, dass der tangentielle Faserverlauf der Kollagenfasern an der Oberfläche des Gelenkknorpels mit den von Pauwels (1959) entdeckten Spannungstrajektorien übereinstimmt. Der parallele Faserverlauf folgt also der Richtung der maximalen Dehnungsbeanspruchung (Abb. 10).



Arkadenstruktur der Kollagenfasern



Patella

Tibiakopf

Femurkondylen

Spaltlinien des Gelenkknorpels

Abb. 10: Arkadenförmige Struktur der Kollagenfasern im Gelenkknorpel und Spaltlinien, die den tangentialen Verlauf repräsentieren (aus Otte et al. 2000)

Nach Otte et al. (2000) sorgt diese Faserstruktur auf der Knorpeloberfläche für Schutz und Stabilität des Gelenkknorpels.

Die biomechanischen Eigenschaften des hyalinen Knorpels werden sowohl durch die Proteoglykane repräsentiert als auch durch die arkadenähnlich integrierten Kollagenfibrillen vom Typ II gewährleistet (Athanasίου et al. 1991, Brommer et al. 2005).

In dieses Kollagengerüst sind Proteoglykane eingelagert, deren Glykosaminoglykane stark sulfatiert sind und sich somit gegenseitig aufgrund der negativen Ladungen abstoßen (Abb. 11).

Diese negativen Ladungen sind hydrophil und ziehen zusätzlich freie Gegenionen ins Gewebe, wodurch ein Schwellungsdruck entsteht, der den Knorpel ohne das Kollagengerüst auf das 5fache anschwellen lassen würde. Nach Rolauffs et al. (2002) steht der Knorpel durch das Zusammenwirken von Kollagen und Glykosaminoglykanen unter einer Vorspannung von etwa 0,1-0,2 MegaPascal (MPa = Million Pa = N/mm²).

Wird der humane Gelenkknorpel bei mechanischer Belastung zusammengedrückt, wird im Gewebe die interstitielle Flüssigkeit mit den freien Gegenionen in den Gelenkspalt verdrängt. Diese Flüssigkeitsströmung kann um das 10fache gesteigert werden, wenn die

Gelenkoberfläche kontinuierlich mit Spitzendrücken von 3,6 MPa (150 % der eigenen Körpermasse) belastet wird (Herberhold et al. 1999).

Die extrazelluläre Matrix verdichtet sich, dadurch wird ihre Permeabilität verringert. Nach Otte et al. 2000 steigt somit der *hydrostatische Druck* im Gewebe aufgrund der verminderten Porengröße bis zu einem so genannten *steady state*, bei dem sich hydrostatischer Druck und die einwirkende Kraft gegenseitig ausgleichen.

Durch die Kompression verkürzen sich gleichzeitig die Abstände der negativen Ladungen der Glykosaminoglykanseitenketten. Diese stoßen sich ab (*Repulsion*), ein weiterer Gegendruck (*elektrostatischer Widerstand*) entsteht (Rolauuffs et al. 2002).

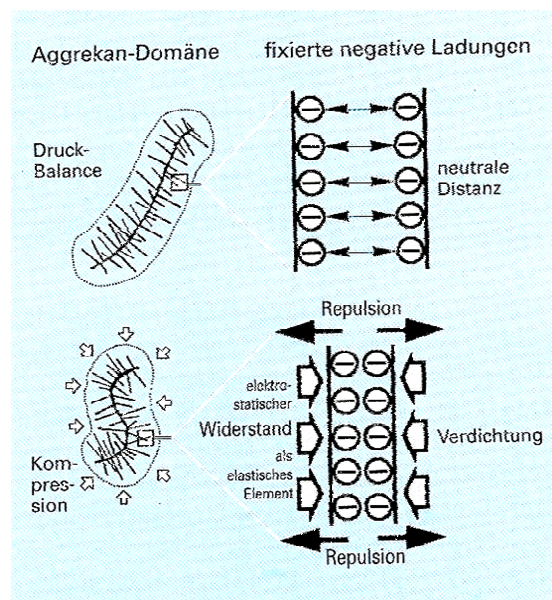


Abb. 11: Repulsion der fixierten negativen Ladungen (aus Otte et al. 2000)

Endet die Druckbelastung, wird aufgrund des hydrophilen Charakters der GAG die interstitielle Flüssigkeit mit ihren freien Gegenionen vom Gelenkspalt in das Knorpelgewebe zurückgezogen. Der Knorpel nimmt seine ursprüngliche Form wieder ein, bis das Kollagenetzwerk erneut Widerstand leistet.

In einer von Herberhold et al. (1999) veröffentlichten Studie wurde die humane Patella über 3,5 Stunden mit 150 % des Körpergewichtes (3,6 MPa) bei verstorbenen Patienten kontinuierlich belastet. Es konnte nach 3,5 Stunden eine Knorpelverformung um 44 % gezeigt werden, wobei

sich der Knorpel in der ersten Minute nur um 7 % verformte, in den folgenden 8 Minuten veränderte sich die Knorpelform um 25%. Physiologisch relevante Belastungsintervalle, die normalerweise mehrere Sekunden bis Minuten andauern, führen also nur zur minimalen Formveränderung des Knorpels. Nach Herberhold et al. (1999) spielt die Verdrängung der interstitiellen Flüssigkeit vom Knorpelgewebe in den Gelenkspalt eine entscheidende Rolle.

Ein hoher Gehalt an parallel angeordneten Kollagenfasern bietet in stark belasteten Gelenkarealen optimalen Widerstand gegenüber intermittierendem Stress. Kollagen repräsentiert nach Hyttinen et al. (2009) die dehnbaren Eigenschaften des Knorpels.

Der gewichtstragende zentrale Gelenkbereich, der größtenteils einer statischen kontinuierlichen Belastung ausgesetzt ist, enthält nach Hyttinen et al. (2009) den höchsten Proteoglykangehalt. Die Proteoglykane repräsentieren nach Ansicht des Autors die viskösen und die Kompressionseigenschaften des Gelenkknorpels.

Athanasίου et al. (1991) sind der Ansicht, dass die biochemische Zusammensetzung die Knorpelsteifigkeit sowie die Permeabilität bestimmt. In der Literatur sind die Zusammenhänge zwischen der Knorpelsteifigkeit, der Knorpeldicke sowie zwischen den einzelnen Knorpelbestandteilen unterschiedlich beschrieben:

- *Franz et al. (2001)* erwähnen in ihrer Studie, dass an den untersuchten Stellen des menschlichen gesunden Kniegelenkes **weder der Proteoglykan- noch der Kollagengehalt mit den Knorpelsteifigkeitswerten** korreliert.
- *Appleyard et al. (2003)* wiesen an gesunden Kniegelenken des Schafes eine **negative Korrelation zwischen der Knorpelsteifigkeit und dem Proteoglykangehalt** nach. Ebenfalls verhielt sich die **Knorpeldicke umgekehrt proportional zum Kollagengehalt**.
- *Die Arbeitsgruppe um Baldassarri (2007)* zeigte bei ihrer Untersuchung am menschlichen Kniegelenk eine **positive Korrelation zwischen der Knorpelsteifigkeit und dem Glykosaminoglykangehalt**. Allerdings wurde bei dieser Studie nicht der DMMB-Assay verwendet.

Kiefer et al. (1989) wiesen nach, dass ein einmaliges Einfrieren und wieder Auftauen des Gelenkknorpels keine Veränderungen bezüglich der biomechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels hervorruft. Der bovine Gelenkknorpel wurde insgesamt 90 Tage bei -79°C eingefroren, eingetaucht in phosphatgepufferter Lösung mit 7,5 % Dimethylsulfoxid (DMSO).

4.1 Mechanische Stimulation des Gelenkknorpels

Nach Eckstein und Müller - Gerbl (1992) ist die Verteilung der subchondralen Knochendichte und der Knorpeldicke an der menschlichen Patella eine funktionelle Anpassung gegenüber längerfristigen Belastungen des Gelenkes.

Kiviranta et al. (1987) zeigten in ihrer Studie, dass das Ruhigstellen von caninen Kniegelenken durch Castverbände über einen Zeitraum von 11 Wochen zu einer signifikanten Abnahme des Glykosaminoglykangehaltes sowie der Knorpelsteifigkeit führt. Davon ausgenommen sind Kontaktflächen wie beispielsweise die Trochlea ossis femoris. Die Knorpeldicke der kalzifizierten Zone nimmt ebenfalls ab. Wird ein Gelenk vermehrt durch Gewicht belastet, nimmt der Glykosaminoglykangehalt vor allem an den stark belasteten Bereichen wie z.B. den Femurkondylen zu. Auffallend ist, dass die Zunahme nur in der mittleren und tiefen Knorpelschicht, sowie im kalzifizierten Bereich nachgewiesen werden kann. In der superfiziellen Schicht dagegen gehen die Glykosaminoglykane durch exzessive Gewichtsbelastung verloren.

Diese Ergebnisse werden auch durch die Studie von Athanasiou et al. (1991) bestätigt. Diese Arbeitsgruppe untersuchte die Kniegelenke von 5 verschiedenen Spezies (Rind, Hund, Mensch, Affe, Kaninchen). Auffallend war zusätzlich, dass trotz einer Zunahme des Proteoglykangehaltes der Kollagengehalt (gemessen durch Bestimmung des Hydroxyprolinegehaltes) unverändert blieb.

Hyttinen et al. (2009) untersuchten am Metakarpalgelenk des Pferdes, ob es während der Wachstumsphase beim Pferd zu Veränderungen im Bereich des Kollagennetzwerkes kommt. Der periphere Gelenkbereich wird bei körperlicher Beanspruchung intermittierenden hohen Druckbelastungen ausgesetzt, das Zentrum des Metakarpalgelenkes unterliegt einer statischen kontinuierlichen Belastung durch das Körpergewicht. Unmittelbar post partum sind die Kollagenfibrillen im zentralen Gelenkareal auffallend parallel angeordnet. Im Randbereich hingegen ist die Kollagenstruktur weniger organisierter. Interessant ist, dass diese Verhältnisse beim adulten Pferd genau umgekehrt sind.

Der strukturelle Umbau des Kollagennetzwerkes findet hauptsächlich in den ersten Lebensmonaten statt. Nach Hyttinen et al. (2009) wird die Architektur des Kollagens beeinflusst durch Häufigkeit und Art der Gelenkbelastung, vor allem im Bereich der oberflächlichen Knorpelschicht. Aber auch der Gesundheitsstatus, das Alter sowie die Tierart

spielen bei der Ausprägung der Kollagenstruktur eine entscheidende Rolle. Innerhalb eines Gelenkes ist die Kollagenarchitektur ebenfalls variabel.

Auf die altersabhängige Verteilung der Proteoglykane im Gelenkknorpel wurde bereits in Kapitel 3.4.2 hingewiesen.

Training erzeugt nach Kiviranta et al. (1987) einen erhöhten Proteoglykangehalt im Knorpel, während der Kollagengehalt unverändert bleibt. Diese Untersuchung wurde an den Kniegelenken von 16 Beaglehündinnen durchgeführt.

Nach Brama et al. (2009) haben gut ausgerichtete Trainingsprogramme beim Fohlen signifikante Effekte auf die biochemischen und ultrastrukturellen Eigenschaften im Gelenkknorpel. Dadurch könnte der Knorpel widerstandsfähiger gegenüber traumatischen Einflüssen werden. Adulter Gelenkknorpel hingegen kann sich an Belastungsveränderungen aufgrund des langen Turnovers von Kollagen (100-200 Jahre beim Mensch bis zur vollständigen Erneuerung) kaum noch anpassen. Demzufolge besitzt adultes Knorpelgewebe zwar Reparaturmechanismen, aber keine Möglichkeit zur Regeneration. Als Ersatzgewebe bildet sich bei kleineren Defekten Faserknorpel. Bei größeren Knorpeldefekten wurde eine partielle Reparatation des Defektes durch fibröses Gewebe, Faserknorpel, zellreichen Knorpel und Knochengewebe beobachtet (Brama et al. 2009).

Da derzeit noch keine Informationen zu Langzeitstudien bezüglich der Trainingsprogramme vorliegen, ist es unklar, ob mit derartigen Programmen positive Auswirkungen erzielt werden können.

4.2 Die mechanische Überbeanspruchung des Gelenkknorpels

In der Literatur ist bis heute noch nicht definiert, wann die Grenze zur mechanischen Belastbarkeit des Gelenkknorpels überschritten ist. Kurz et al. (2001) beschreiben in ihrem Artikel, dass in humanen Hüft- und Kniegelenken bei normaler Belastung Druckbeanspruchungen bis zu 20 MPa sowie Kompressionen um bis zu 6 % der Gewebestärke gemessen wurden und somit als Referenzwerte für die physiologische Beanspruchung des Knorpelgewebes angesehen werden können.

Anhand von experimentell erzeugten osteoarthrotischen Veränderungen am Gelenkknorpel im Tiermodell konnte durch Adams et al. (1995) gezeigt werden, dass vor der morphologisch bzw.

histologisch erkennbaren Knorpeldestruktion zunächst eine Hypertrophie des Knorpelgewebes auftritt. Dabei kommt es nur zu einer Zunahme der Extrazellulärmatrix, nicht der Zellen. Adams et al. (1995) vermuten, dass der Gelenkknorpel auf diese Weise versucht, sich der vermehrten Beanspruchung anzupassen. Die Chondrozyten verstärken unter dem gesteigerten Stress ihre Syntheseleistung. In diesem hypermetabolischen Knorpel wurde eine aufs Doppelte erhöhte Expression von Proteoglykan festgestellt.

In der Studie von Oakley et al. (2004) wurde bei Schafen 4 Wochen nach einer medialen Menispektomie eine Zunahme der Knorpeldicke im Bereich des medialen Femurkondylus um 15-20 % nachgewiesen. Die Knorpeldicke nahm bis zur 16. Woche post operationem weiter zu.

Die Arbeitsgruppe um Athanasiou (1991) bestätigt diese Ergebnisse an 5 verschiedenen Spezies (Rind, Hund, Mensch, Affe, Kaninchen). Zusätzlich wiesen sie in ihrer Studie nach, dass in gesunden Knien von Kaninchen 30 % der Proteoglykane in aggregierter Form vorliegen. Keine Proteoglykanaggregate waren im experimentell erzeugten osteoarthrotisch veränderten Gelenkknorpel nachweisbar. Ursächlich wurde bei den pathologisch veränderten Gelenken eine Fehlstruktur des Link-Proteins, der Hyaluronsäure sowie der an die Hyaluronsäure bindenden Untereinheit des Proteoglykanmoleküls nachgewiesen (Appleyard et al. 2003).

Im früharthrotischen Knorpel ist die Expression von matrixabbauenden Enzymen nachgewiesen. Kommt es nun im weiteren Verlauf zu einer enzymatisch oder traumatisch bedingten Zerstörung des Kollagenfasengerüsts, können die Kollagenfibrillen nicht mehr als Gegenspieler der Glykosaminoglykane das Gewebe zusammenhalten. Wie in Kapitel 3.4.1. bereits beschrieben, durchläuft das Prokollagenmolekül bis zur Fibrillenbildung mehrere biochemische Schritte. Die kleinen Proteoglykane (Biglykan, Decorin und Fibromodulin) sind wesentlich an der stabilen Zusammensetzung des Kollagenmoleküls beteiligt. Insofern ist ein Ungleichgewicht dieser Komponenten in Betracht zu ziehen.

An die hypertrophe Phase schließt sich im weiteren Verlauf die Abnahme der Proteoglykane an. Die vermehrte Aktivität der Matrixmetalloproteinasen könnte ebenfalls ein Grund für die vermehrte Freisetzung der Glykosaminoglykane aus dem geschädigten Knorpelgewebe sein. Nach Otte et al. (2000) findet eine enzymatische Auflösung der großen Makromolekülaggregate statt und die Fragmente können durch das gelockerte Fasernetz entweichen. Durch den Verlust der Proteoglykane sinkt der hydrostatische Druck. Es kommt zu

einer vermehrten Wassereinlagerung in das Knorpelgewebe (Appleyard et al. 2003, Julkunen et al. 2008), da durch das gelockerte Kollagenfasernetz mehr Quellungsvolumen verfügbar wird.

Die Chondrozyten sind postmitotisch und können bei Destruktion meistens nicht ersetzt werden. Folglich kann die extrazelluläre Matrix ebenfalls nicht regeneriert werden. Es kommt zur unaufhaltsamen fortschreitenden Knorpeldegeneration.

4.3 Ansatzpunkte zur Diagnose von geschädigtem Knorpel

- *klinische Untersuchung*
- *Röntgen*
- *Computertomographie*
- *diagnostische Arthroskopie*
- *Untersuchungen auf Knorpelabriebprodukte oder Veränderungen der Zusammensetzung in der Synovia*
- *Magnetresonanztomographie*
- *elektromechanische Untersuchungen*
- *Ultraschall - Untersuchungen*
- *mechanischer Eindrückttest*
- *kombinierte Verfahren*

Die Beurteilung des Gelenkknorpels ist einerseits wichtig für die Auswahl der Therapie, andererseits auch entscheidend für die Prognose. Während bei einer akuten aseptischen Arthritis die intraartikuläre Applikation von Glukokortikoiden das Mittel der Wahl darstellt, wäre dies bei bereits degeneriertem Knorpel kontraindiziert. Diese Umstände machen eine aussagekräftige Darstellung von Gelenkknorpeldefekten wünschenswert, welche unter *in vivo* Bedingungen nur eingeschränkt möglich ist.

Neue Therapiemöglichkeiten zur Behandlung von Gelenkknorpeldefekten wie z. B. die autologe Chondrozytentransplantation, Mosaikplastik oder die Behandlung mit

chondroprotektiven Medikamenten benötigen genaue Diagnosen und zuverlässige bildgebende Verfahren zur Kontrolle hinsichtlich ihrer Effektivität.

- Röntgen

Kalkloser Gelenkknorpel und bereits abgenutztes Knorpelgewebe sind nach Hartung (2006) röntgenologisch nur indirekt nachzuweisen, stellen aber den Ausgangspunkt bei einer primärdegenerativen Arthropathie dar. Daher sollte auf Röntgenaufnahmen beim Pferd grundsätzlich nicht verzichtet werden. Ein unregelmäßiger Gelenkspalt sowie eine veränderte Gelenkstellung sind auf Knorpelschäden hinweisend. Der im Röntgenbild darstellbare Gelenkspalt wird nach Hartung (2006) begrenzt durch den kalzifizierten Gelenkknorpel und die Knochengrenzlamelle. Nimmt die Knorpelsteifigkeit ab, wird die Knorpel-Knochengrenze stärker belastet. Die Gelenklinie wird im Röntgenbild deutlicher, häufig kann in diesem Zusammenhang eine „Verschmälerung“ des Gelenkspaltes beobachtet werden (Hartung 2006).

Bei der röntgenologischen Untersuchung sind nach Hartung (2006) subchondrale Umbauprozesse hinweisend für eine Arthropathie. Aufgrund der vermehrten Belastung reagiert der subchondrale Knochen mit Umbauprozessen. Es entstehen so genannte zystoide Defekte. Ist der Gelenkknorpel vollständig zerstört, wird der freiliegende Knochen mit Pannusgewebe bedeckt. Verlaufen die Knochenendplatten kongruent, kann das Pannusgewebe den Gelenkspalt überbrücken (innere Ankylose). Fibröse Ankylosen sind im Röntgenbild schwierig nachzuweisen, ossäre dagegen sind deutlicher.

Erste Knorpelveränderungen sind röntgenologisch indirekt als Randwülste zu erkennen. Sie entstehen nach Hartung (2006) aus der subchondralen Spongiosa und werden mit Knorpel überzogen. Zusätzlich können periostale Knochenneubildungen entstehen. So genannte Binnenrandwülste lassen sich im Röntgenbild an den Ansatzstellen intraartikulärer Bänder nachweisen.

Hinweisend für aseptische Knorpelschädigungen im Gelenk können unter anderem nach Kauffmann et al. (2001) sein:

- Gelenkflächen einbeziehende Frakturen
- Anzeichen einer Osteochondrose bzw. Osteochondrosis dissecans (knöcherne Defekte, „Knorpelschuppe“ mit anhängendem subchondralem Knochenanteil)

- Computertomographie

Nach Vyhmeister (2002) können mittels Computertomographie (CT) knöcherne Veränderungen dargestellt werden. Eine Beurteilung von Knorpelveränderungen ist nur indirekt möglich. Der Informationsgehalt ist im Vergleich zu konventionellen Röntgenaufnahmen, bei gleichzeitig höherer Strahlenbelastung nicht größer. Daher ist CT in der Diagnostik von Knorpelschäden verzichtbar. Eine computertomographische Arthrographie mit Positivkontrastmittel kann nach Vyhmeister (2002) mit einer Sensitivität von 31,4 % Knorpelläsionen am Fesselgelenk des Pferdes nachweisen.

- diagnostische Arthroskopie

Die diagnostische Arthroskopie beim Pferd ermöglicht nach McIlwraith et al. (2005) eine detaillierte Beurteilung im einsehbaren Knorpelbereich. Bei dieser Untersuchungsmethode wird im Bereich des Gelekknorpels auf Knorpelläsionen (u.a. Fibrillierung, Risse, Schleifspuren, Usuren, Verdünnung, Mangel, Verdickung, Ablösung) geachtet. Sie zählt zu den invasiven Untersuchungsverfahren. Die Indikation zur diagnostischen Arthroskopie besteht bei Verdacht auf Knorpelschaden im Gelenk oder bei anhaltenden unklaren Gelenkbeschwerden (Behrens 2004). Ein positiver Nebeneffekt ist die kombinierbare therapeutische Gelenkspülung. Diese Methode stößt aber beispielsweise für das Hufgelenk aufgrund des kleinen Sichtfensters an ihre Grenzen. Hinzu kommen wieder hohe Anschaffungskosten, die notwendige Narkose sowie spezielles Fachwissen und Können. Nach McIlwraith et al. (2005) hat sich die Arthroskopie als Methode zur Behandlung einer Osteochondrosis dissecans (OCD) am **Femoropatellargelenk** des Pferdes gegenüber der Arthrotomie durchgesetzt. Durch den minimal invasiven Eingriff lassen sich Wundheilungsstörungen reduzieren. Weitere Indikationen zur diagnostischen Arthroskopie des **Femoropatellargelenkes** beim Pferd sind nach McIlwraith et al. (2005) beschrieben:

- Frakturen der Patella
- Splitterfrakturen im distalen Bereich der Patella

Die Indikation zur diagnostischen Arthroskopie des *Femorotibialgelenkes* sind nach McIlwraight et al. (2005):

- subchondrale Zysten/Knorpelläsionen im Bereich des medialen Femurkondylus
- subchondrale Zysten im Bereich der proximalen Tibia
- Fraktur der Eminentia intercondylaris
- Partielle Rupturen der Kreuzbänder
- Meniskuläsionen sowie Defekte im Bereich der entsprechenden Bänder der Menisken

- Untersuchung auf Knorpelabriebsprodukte oder Veränderungen der Zusammensetzung in der Synovia

Erkrankungen der Gelenke verursachen eine veränderte Zusammensetzung der Synovia. Nach Drommer (2006) eignet sich die licht- und elektronenmikroskopische Synoviadiagnostik beim Pferd zur Früherkennung bei Arthrose. Der Zellgehalt ist bei arthrotisch veränderten Gelenken erhöht (2000 – 3000/ml). Zusätzlich lassen sich Knorpelfragmente nachweisen, die entweder zellfrei sind oder degenerativ verfettete Chondrozyten und Clusterbildungen enthalten. In gering- bis hochgradiger Menge sind Synoviadeckzellen vom Typ A und vereinzelt vom Typ B in der Synovia zu diagnostizieren.

In der Studie von Sousa et al. (2008) konnte bei Pferden mit degenerativen Gelenkerkrankungen ein signifikanter Zusammenhang zwischen Knorpelabriebsprodukten in der Synovia und der Schädigung der Gelenkoberfläche nachgewiesen werden.

- Magnetresonanztomographie (MRT)

Die Magnetresonanztomographie ist das am besten geeignete, nichtinvasive Verfahren, um Knorpelläsionen direkt darzustellen und zu beurteilen (Rubenstein et al. 1993, Nieminen et al. 2001, Nissi et al. 2004, Wheaton et al. 2004, Julkunen et al. 2008). Die exakte Lokalisation des Knorpelschadens, eine verlässliche Beurteilung der Defekttiefe sowie Veränderungen des subchondralen Knochens sind feststellbar.

In der Humanmedizin existieren bereits umfangreiche Arbeiten zur MRT -Diagnostik im Gelenkbereich. Es wird zwischen „High - Field“ - und „Low - Field“ -MRT unterschieden. Das konventionelle „High - Field“ -MRT ermöglicht zwar nach Schulze et al. (2008) eine Möglichkeit, Knorpeldefekte nahezu vollständig zu diagnostizieren, jedoch limitieren hohe Anschaffungs- und Unterhaltungskosten die wirtschaftliche Tragfähigkeit in der Tierarztpraxis. Außerdem ist für den Einsatz des „High - Field“ -MRT (9,4 T) eine Narkose notwendig. Aufgrund des Narkoserisikos (nach Ionita et al. 2007 bei elektiven Eingriffen <10 %) und der geringen Akzeptanz der Besitzer für das Niederlegen ihres Pferdes im Rahmen einer diagnostischen Untersuchung ist der routinemäßige Gebrauch eingeschränkt.

Mittels der „Low - Field“ - Technik (<2 T) ist es möglich, eine MRT -Untersuchung am stehenden sedierten Pferd durchzuführen. Die Studie von Schulze et al. (2008) zeigt jedoch, dass so genannte Usuren oder oberflächliche Abnutzungserscheinungen erst festgestellt werden können, wenn bereits 50 % der Knorpeldicke betroffen sind.

Baldassarri et al. (2007) bestimmten in ihrer Studie am menschlichen Tibialplateau den dGEMRIC Index. Dieser Parameter korreliert deutlich mit den Werten zur Knorpelsteifigkeit. In dieser Studie wurden jeweils 6 gesunde Kniegelenke und 6 Kniegelenke mit Osteoarthritis verwendet. Eine direkte Messung mit der Indentermethode sei nach Ansicht der Autoren aber genauer. Herberhold et al. (1999) zeigten in ihrer Veröffentlichung, dass mit der Kernspintomographie am menschlichen Kniegelenk Knorpeldeformationen und Knorpelvolumina unter in vitro Bedingungen genau dargestellt werden können.

- **elektromechanische Untersuchung**

Sachs und Grodzinsky (1995) untersuchten den menschlichen Gelenkknorpel mittels elektromechanischer Spektroskopie. Dabei werden mit einer Sonde auf der Knorpeloberfläche periodische Auslenkungen erzeugt, die zu elektrischen Strömungspotentialen und mechanischem Stress führen. Aus dem gesetzten Oberflächenreiz lassen sich anhand von Frequenz, Wellenlänge, Amplitude, Eindringtiefe des Reizes sowie dem Reizpotential materielle Eigenschaften wie beispielsweise die Gewebedicke, dessen Permeabilität und elektrokinetische Koeffizienten ableiten.

- **Ultraschall**

In einer von Disler et al. (2000) veröffentlichten in vitro Studie konnte an eröffneten Kniegelenken beim Schwein und beim Mensch gezeigt werden, dass sich die Real - time Sonographie zur Diagnose von Defekten im Gelenkknorpel eignet. Im Rahmen dieser Studie ermittelten zwei erfahrene Radiologen unabhängig voneinander eine Sensitivität für diese Methode mit 93-94%. Die Spezifität für das Gerät lag zwischen 77-90%. Es wurde ein mit 5-12 MHz Linearschallkopf verwendet. Mit hoher übereinstimmender Zuverlässigkeit konnten die beiden Untersucher chirurgisch durchgeführte Knorpeldefekte unterschiedlichen Grades mittels Ultraschall erkennen und eindeutig zuordnen.

- **mechanischer Eindrückttest**

Bereits 1944 wurde der Eindrückttest von Hirsch et al. angewendet, um das Kompressionsverhalten von gesundem Knorpel und chondromalazisch verändertem Knorpel zu untersuchen. Ergebniss der Studie war, dass sich der chondromalazische Knorpel weiter eindrücken ließ als der gesunde (Kempson et al. 1970).

Bei der "Indenter-Messung" wird Knorpel lokal mit einem starren Stempel belastet. Dabei wird die Knorpeloberfläche nicht verletzt, die Kollagenfaserstruktur bleibt erhalten. Das Prinzip dieses Eindrückttestes beruht auf der Messung der Widerstandskraft und des viskoelastischen Verhaltens von Knorpelgewebe.

Diese so genannte "Knorpelsteifigkeit" bezeichnet hier die Elastizität der extrazellulären Matrix des Knorpels (Korhonen et al. 2002).

Zur Messung der Knorpelsteifigkeit eignet sich das Gerät Artscan®200 (Artscan medical innovations, Kuopio). Die Aufzeichnung der Messwerte erfolgt mit dem Programm Artscan® 200 Version 1.0. Vereinfacht dargestellt arbeitet dieses Computerprogramm nach folgender Formel, welche als Grundlage für die Berechnung dient:

$$E = \frac{F(1 - \nu^2)}{2a\omega k(a/hv)}$$

E= Young's Modulus;

F= Kraft, die von der Messsonde auf den Knorpel ausgeübt wird;

ν = Poissons'ratio;

a= Zapfenradius;

ω = durch Kraft verursachte Deformation;

k= Korrekturfaktor (berücksichtigt die variable Knorpeldicke)

h= Knorpeldicke

Die *Poisson's ratio* „ ν “ lässt sich durch optische Methoden (Kiviranta et al. 2006) oder rechnerisch am theoretischen Modell bestimmen (Lu und Zheng 2004). Dieses Verhältnis repräsentiert den Kollagengehalt und die Struktur des Kollagennetzwerkes. Das *Young'sche Modul* wird mit dem Proteoglykangehalt des Gelenkknorpels assoziiert (Julkunen et al. 2008, Kiviranta et al. 2006, Brommer et al. 2005).

Die Arbeitsgruppe um Kiviranta (2006) zeigte in ihrer am bovinen Gelenkknorpel durchgeführten Untersuchung, dass im Bereich der superfiziellen Knorpelschicht, also in einer Region mit sehr hohen Kollagengehalten, niedrige Werte zur Poisson's - Zahl gemessen werden. Vor allem die oberflächliche Knorpelschicht weise eine besonders hohe Knorpelsteifigkeit auf. Diese Ergebnisse stimmen mit der Aussage von Korhonen et al. (2002) überein.

In der Dissertation sowie in der Publikation von Engl (2007, 2008) konnte mit dem Indentermeßgerät der Fa. Artscan® 200 (Artscan medical innovations, Kuopio) ein fest verteiltes Muster der Knorpelsteifigkeit über dem gesunden Femur sowie über den Talus beim adulten Pferd nachgewiesen werden. Julkunen et al. (2008) fanden anhand der Indentermethode heraus, dass die Knorpelsteifigkeit bereits schon um mehr als 50% abgenommen hat, wenn erste makroskopisch sichtbare Knorpelschäden auffallen.

In einer Studie von Lyrra et al. (1999) konnte anhand von enzymatisch degradierten Knorpelproben bestätigt werden, dass das Indentermessgerät beginnende oberflächliche Defekte im Kollagennetzwerk sowie verminderte Proteoglykangehalte in Form von abnehmenden Knorpelsteifigkeitswerten erkennt. Für diese Studie wurde ein flach endender Messstab verwendet, welcher eine konstante Verformung von 300 µm auf der Knorpeloberfläche verursacht. Die Aufdruckkraft betrug 10 Newton.

Wird gesunder Knorpel mit einer definierten Kraft konstant belastet, so entsteht initial eine elastische Verformung mit relativ schnell auftretender Deformation. Die vom Knorpel ausgeübte Widerstandskraft stellt sich zeitabhängig auf einen Gleichgewichtswert ein (*Spannungsrelaxation*).

Bei gleichbleibender Belastung kommt es danach zu einem langsamen, nicht linearen Zunehmen der Deformation über einen längeren Zeitraum, die als die sogenannte Kriechphase (*“creep”*) bezeichnet wird.

In der Literatur werden speziespezifische Unterschiede zur sogenannten *“creep equilibrium time”* beschrieben. Nach Athanasiou et al. (1991) variiert diese Zeit von 18.000 Sekunden bei Kaninchen bis hin zu 10.800 Sekunden beim Menschen.

Endet die Druckbelastung, tritt die *Erholungsphase* ein und der Knorpel nimmt seine ursprüngliche Form wieder an. In der Literatur wird eine Erholungsphase für Knorpel mit drei Minuten angegeben (Mutschler et al. 1984).

Das Kriechverhalten des Knorpels dauert nach Athanasiou et al. (1991) wesentlich länger als die Erholungsphase.

Was wird denn bei der Knorpelsteifigkeit eigentlich gemessen?

Das Prinzip dieses Eindrückttests beruht auf der Messung der Widerstandskraft und dem viskoelastischen Verhalten von Knorpelgewebe.

- Die *Arbeitsgruppe um Baldassarri (2007)* bestätigt in ihrer Untersuchung am menschlichen Kniegelenk, dass die biomechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels *durch die Glykosaminoglykane und das Kollagenfasergewüst* repräsentiert werden.

- **Kurz et al. (2001)** beschäftigen sich mit der **Abnahme der Steifigkeit** von Knorpelimplantaten nach experimentell erzeugter Schädigung. Die Autoren vermuten, dass diese abnehmende Größe die **Zerstörung des Kollagenfasergerüsts** repräsentiert.
- Nach **Rolauffs et al. (2002)** ist der **physiologische Schwellungsdruck des humanen Gelenkknorpels vom Glykosaminoglykangehalt abhängig**. Ein **Verlust der Glykosaminoglykane** aus dem Knorpelgewebe, könnte nach Aussagen des Autors eine **Abnahme der Knorpelsteifigkeit** bedeuten.
- Die Studie von **Korhonen et al. (2002)** besagt, dass die **superfizielle Knorpelschicht**, welche im Wesentlichen durch das **Kollagen** repräsentiert wird, eine wichtige Rolle bei der Bestimmung der **Knorpelsteifigkeit** spielt. Auch hier wurde die Untersuchung mit einem Indentermessgerät am bovinen Gelenkknorpel durchgeführt.
- **Julkunen et al. (2008)** bestätigen diese Aussage. Eine **intakte** oberflächliche Kollagenschicht verleihe dem Gelenkknorpel eine hohe Knorpelsteifigkeit.
- Auch die Arbeitsgruppe um **Brommer (2006)** ist der Ansicht, dass mit dem Indentergerät nur die strukturelle Integrität des oberflächlich gelegenen Kollagens bestimmt wird. Es könne weder eine Aussage zum Kollagengehalt, noch zum biochemischen Aufbau des Kollagens getroffen werden.
- Nach **Franz et al. (2001)** kommt es durch Aufsetzen der Messsonde (Artscan® 1000) zu einer konstanten kurzzeitigen Deformation des Knorpels um 300 µm für ungefähr 1 Sekunde. Diese Arbeitsgruppe verwendete am humanen Kniegelenk eine Aufdruckkraft von 10 Newton sowie einen zylindrisch geformten Indenter (1,0 mm Durchmesser, 0,3 mm Länge). Dieser Gerät stellt das Vorläufermodell zu Artscan® 200 dar. Nach Ansicht des Autors wird in diesem Fall der **Knorpelwiderstand durch die Intaktheit des Kollagenfasergerüsts** repräsentiert und nicht durch die Proteoglykane. Die Indentermessung verursacht lediglich eine **Dehnung der oberflächlichen Kollagenfasern**. Der Autor beruft sich auf zahlreiche Studien, die sich mit dem enzymatischen Knorpelverdau beschäftigt haben:
- **Bader et al. (1994)** stellten am humanen Gelenkknorpel fest, dass die Knorpelsteifigkeit trotz vollständigem Proteoglykanverdau dennoch unverändert blieb. Die Knorpelsteifigkeit reduzierte sich erst nach enzymatischem Abbau des Kollagenfasergerüsts. Diese

Ergebnisse wurden durch die Untersuchungen von *Appleyard et al. (2003)* bestätigt. Diese Arbeitsgruppe wiesen die Ergebnisse am Gelenkknorpel von Schafen nach.

Brommer et al. (2006) untersuchten mit dem Indentersystem pathologische Knorpelveränderungen am Karpalgelenk des Pferdes. Zur Klassifizierung osteoarthrotischer Veränderungen wurde der CDI (Cartilage Degeneration Index) verwendet. Eine Abnahme der mittels Indenter bestimmten Knorpelsteifigkeitswerte wurde erst ab einem CDI von 50 %, also einer hochgradigen Veränderung des Gelenkknorpels festgestellt. Nach Ansicht der Autoren eignet sich die Messsonde also nicht, um frühe Stadien der Osteoarthrose zu diagnostizieren.

In der von *Athanasίου et al. (1991)* veröffentlichten Studie wurden die biomechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels (Knorpelsteifigkeit, -permeabilität, Poissons'ratio) am gesunden menschlichen distalen Femur sowie am gesunden distalen Femur von verschiedenen Tierarten (Rind, Hund, Affe, Kaninchen) vergleichend untersucht. Die **Knorpelsteifigkeit war im Trochleabereich am niedrigsten, die Permeabilität war in diesem Areal am höchsten**. Es wurden keine speziesspezifischen Unterschiede festgestellt.

Die Werte zur Poissons'ratio waren im Trochleabereich bei fast allen Spezies am niedrigsten.

Lediglich das Kaninchen zeigte hohe Werte in diesem gemessenen Areal. Die Autoren vermuten, dass der **Trochleabereich** mit zu den **weniger belasteten Bereichen** des Kniegelenkes zählt. Die Arbeitsgruppe wies in diesem Bereich zusätzlich einen niedrigen Proteoglykangehalt nach. Der Kollagengehalt war jedoch höher als an anderen Stellen.

Hohe Werte zur Poissons'ratio wurden bei allen Spezies an den **Femurkondylen** gemessen (*Athanasίου et al. 1991*).

In der Literatur dargestellte Aussagen zur Indentermessung sind oftmals sehr widersprüchlich:

- *Swann und Seehom (1993)* berichten in ihrer Studie, dass die mittels Indentermessung ermittelte **größte Knorpelsteifigkeit** und damit auch die **größte Belastung an den menschlichen Femurkondylen** vorliegt. Die femurale Gleitfläche der Patella ist weicher und die niedrigste Knorpelsteifigkeit wurde am Faserknorpel der Menisken gemessen.
- Diese Aussage stimmt mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um *Franz (2001)* überein, die ebenfalls mit Artscan am menschlichen Kniegelenk gearbeitet hatten.

- Beim humanen Kniegelenk war der *laterale Kondylus* des distalen Femur derjenige Bereich, der die *größte Knorpelsteifigkeit* zeigte (Athanasίου et al. 1991).

- *Temple-Wong et al. (2009)* dagegen bezeichnen den *medialen Femurkondylus* als den am meisten belasteten Bereich des Kniegelenkes beim Menschen.
- Diese Ansicht bestätigen auch *Räsänen und Messner (1996)* sowie *Lyyra et al. (1999)*, die ihre Untersuchung an mehreren Haustierarten durchgeführt haben.

- *Froimson et al. (1997)* wiesen mittels Indentermessung nach, dass der *mediale Knorpelbereich der humanen Patella* eine *geringere Knorpelsteifigkeit* aufweist als der laterale.

- Diese Aussage stimmt mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um *Lyyra et al. (1999)* nicht überein.

- **Ultraschall gesteuerter Eindrückttest**

Laasanen et al. (2003) entwickelten ein kombiniertes Verfahren, bestehend aus einem Indentermessgerät mit einer gekoppelten Ultraschallsonde. Damit ist es möglich, neben der Knorpelsteifigkeit auch die Knorpeldicke durch das A-Mode-Verfahren zu bestimmen. Zusätzlich erkennt das Gerät frühe Anzeichen einer Osteoarthritis, definiert nach dem Mankin Score ≤ 2 , siehe Kap. 3.2). Allerdings ist die entwickelte Konstruktion von Laasanen et al. (2003) zu komplex, um in der Arthroskopie eingesetzt zu werden. Das B-Mode-Verfahren liefert nach Ansicht des Autors zusätzliche visuelle und quantitative Informationen zum Knorpel und zur subchondralen Knochenstruktur.

4.4 Knorpeldicke

Eine vergleichende Studie von Frisbie et al. (2006) hat ergeben, dass die Knorpeldicke im Kniegelenk des Pferdes weitestgehend der Knorpeldicke des humanen Kniegelenkes entspricht. Damit eignet sich das Pferd als Tiermodell bei der Erforschung degenerativer Gelenkerkrankungen. In Tab. 4 sind die histologisch ermittelten Werte zur Knorpeldicke nach Frisbie et al. (2006), bestehend aus kalzifiziertem und nicht kalzifiziertem Knorpel an unterschiedlichen Lokalisationen (PMT = proximaler Bereich der medialen Tibia; DMT = distaler Bereich der medialen Tibia; LT = laterale Trochlea; PMC = proximaler Bereich des medialen Kondylus; DMC = distaler Bereich des medialen Kondylus) beim Mensch und verschiedenen Tierarten aufgeführt:

Tierart	PMT in mm	DMT in mm	LT in mm	PMC in mm	DMC in mm
Mensch	2,6 ± 0,03	2,46 ± 0,03	2,88 ± 0,03	2,41 ± 0,03	2,52 ± 0,03
Pferd	1,83 ± 0,03	1,76 ± 0,03	2,16 ± 0,03	2,22 ± 0,03	2,2 ± 0,03
Hund	0,52 ± 0,03	0,53 ± 0,03	0,53 ± 0,03	0,77 ± 0,03	0,73 ± 0,03
Ziege	0,8 ± 0,03	0,79 ± 0,03	0,7 ± 0,03	1,23 ± 0,03	1,51 ± 0,03
Schaf	0,56 ± 0,03	0,56 ± 0,03	0,71 ± 0,03	0,54 ± 0,03	0,61 ± 0,03
Kaninchen	0,22 ± 0,03	0,31 ± 0,03	0,31 ± 0,03	0,34 ± 0,03	0,27 ± 0,03

Tab. 4: Mittelwerte zur Knorpeldicke in mm mit Standardabweichung beim Mensch und verschiedenen Tierarten an unterschiedlichen Lokalisationen (nach Friesbie et al. 2006)

Zu unterscheiden sind Dickenzunahmen im Verlauf einer physiologischen Anpassung an die Belastung und der pathologische Prozess des Anschwellens des Gelenkknorpels durch erhöhte Wasseraufnahme.

In einer Studie von Meachim et al. (1977) wurde in der Humanmedizin der Einfluss des Alters auf die Knorpeldicke der Patella untersucht. Mit zunehmendem Alter konnte vor allem bei Frauen ein signifikante Abnahme der Knorpeldicke beobachtet werden. Betont wird aber, dass dies auf den Verlust von Knorpelsubstanz durch pathologische Prozesse wie z.B. Läsionen und Auffaserung im Bereich der Knorpeloberfläche zurückzuführen ist. Vor allem bei weiblichen Patienten fortgeschrittenen Alters konnten gleichzeitig auch zunehmende Veränderungen wie beispielsweise osteophytäre Zubildungen nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurde auch festgestellt, dass Läsionen und Auffaserung im oberflächlichen Bereich des Gelenkknorpels begleitet waren von einer Schwellung der darunterliegenden Matrix. In diesen Arealen konnte auch eine auffallend vermehrte Knorpeldicke nachgewiesen werden.

Die Dicke für Gelenkknorpel ist abhängig von der Entwicklung, sowie vom Grad der epiphysären Ossifikation. Die Arbeitsgruppe um Tomlinson et al. (2000) beschreibt bei equinen Neonaten eine Knorpeldicke für den medialen Trochleakamm des Femur von über 25 mm. Ebenso wurden bei jungen Pferden im Tibiabereich Werte bis zu 2,4 mm ermittelt, die deutlich höher sind als im Vergleich zu adulten Tieren.

4.4.1 Möglichkeiten zur Bestimmung der Knorpeldicke

- *Sonographie*
- *Nadelsonde*
- *Magnet resonance imaging*
- *Histologie*
- *Messlupe*
-

- Sonographie

Pro: Zahlreiche Arbeitsgruppen zeigten in ihren Studien, dass die Knorpeldicke am distalen Femur bei Mensch und Pferd mittels Ultraschall sowohl unter in vivo als auch unter in vitro Bedingungen zuverlässig gemessen werden kann (Castriota-Scanderberg et al. (1996), Tomlinson et al. (2000), Mathiesen et al. (2004), Lee et al. (2008), Naredo et al. (2008). Bei diesen Untersuchungen wurde ein Linearschallkopf mit einer Frequenz zwischen 5 – 14 MHz verwendet.

Die Intensität des reflektierten Echos ist am größten, wenn der Einfallswinkel senkrecht zur Knorpeloberfläche erfolgt. In diesem Fall ist die Schallsonde korrekt positioniert, der im Ultraschallbild sichtbare Rand der Knorpeloberfläche sowie die hyperechogene Reflexzone zum subchondralen Knochen sind scharfrandig und eindeutig definierbar (Barthez et al. 2007).

Nach McCune et al. (1987) kann gesunder Gelenkknorpel beim Mensch unter in vivo Bedingungen mittels Ultraschall einfach dargestellt werden. Dies gilt nur für bestimmte Bereiche im Gelenk, die mittels Ultraschall eingesehen werden können. Dicht und regulär angeordnetes Kollagen sorgt für eine einheitliche Übertragung der Schallwellen und stellt den Knorpel basierend auf dem hohen Wassergehalt als homogenes anechogenes Band dar. Für die Studie von McCune et al. (1987) wurde ein 7,5 MHz Linearschallkopf verwendet.

Naredo et al. (2008) demonstrierten an 8 menschlichen Kniegelenken von Leichen die Reproduzierbarkeit der sonographischen Knorpeldickenmessung durch zehn verschiedene erfahrene Untersucher. Im Anschluss an die Ultraschallmessungen, verwendet wurde ein 14 MHz Linearschallkopf, wurde die Knorpeldicke mit einer Messlupe bestimmt. Im Vergleich der mittels Ultraschall ermittelten Werte fiel eine hohe Übereinstimmung zwischen den einzelnen Untersuchenden auf (Intraclass correlation coefficient (ICC): 0,965-0,754). Innerhalb eines Untersuchers war die Übereinstimmung gut bis akzeptabel (ICC 0,696-0,832). Die durch die Messlupe bestimmten Ergebnisse waren im Vergleich zur sonographischen Knorpeldickenmessung genauer.

Tomlinson et al. (2000) ermittelte am stehenden sedierten Pferd mittels Real-time Sonographie Referenzwerte zur Knorpeldicke am Sprunggelenk. Die Untersuchung erfolgte mit einem 7,5 MHz Linearschallkopf. Die Messwerte lagen beim adulten Pferd zwischen 0,5 und 0,9 mm für die beiden tarsalen Trochleakämme.

In der Dissertation und Publikation von Engl (2007) wurde die Knorpeldicke am Sprunggelenk des Pferdes mittels einer Messlupe der Firma Peak® Japan bestimmt. Diese Werte stimmten im Wesentlichen mit denen von Tomlinson et al. (2000) sonographisch ermittelten Ergebnissen überein.

Kontra: Barthez et al. (2007) diskutieren die Sonographie als Methode zur Bestimmung der Knorpeldicke unter in vitro Bedingungen kritisch. Ihrer Ansicht nach entsteht bei der Anwendung des B-Mode-Verfahrens am hyalinen Knorpel des equinen Metakarpalgelenkes eine Fehlerquote von 5-10 %, basierend auf einer höheren Schallwellengeschwindigkeit für

Knorpel (1696 m/s). Für die Studie von Barthez et al. (2007) wurde ein 5-10 MHz Linearschallkopf verwendet. Im Handel verfügbare übliche Geräte arbeiten mit einer niedrigeren Schallwellengeschwindigkeit für biologisches Gewebe (1540 m/s). Die Literatur beschreibt unterschiedliche Werte für die Schallwellengeschwindigkeit für Knorpelgewebe. Dies könnte nach den Ansichten von Barthez et al. (2007) auf der unterschiedlichen Ausrichtung und Stabilität der Kollagenfasern beruhen.

Yao und Seedhom (1999) bestimmten ebenfalls mittels der Real-time Sonographie die Knorpeldicke am eröffneten Kniegelenk bei verstorbenen Menschen und ermittelten dabei aufgrund der unterschiedlichen Schallgeschwindigkeiten eine Fehlerquote von 33,6%. Für diese Untersuchung wurde ein 7,5 MHz Linearschallkopf verwendet.

Pathologische Befunde

Disler et al. (2000) beschreiben in ihrer Veröffentlichung, dass die Knorpeldicke beim gesunden eröffneten Gelenk im Ultraschall leicht erkennbar ist und begrenzt wird durch den stark reflektierenden subchondralen Knochen sowie durch die hyperechogene Knorpeloberfläche. Somit sind nach Ansicht der Autoren neben der Knorpeldicke auch feinste Läsionen, oberflächliche Knorpelerosionen sowie partielle Knorpeldefekte im Schallbild sichtbar. Unter Verwendung eines 5 – 12 MHz Linearschallkopfes wurden die eröffneten Kniegelenke von Schweinen und bereits verstorbenen Menschen untersucht.

Abnehmende Knorpeldicke sowie undeutlich werdende Knorpelkonturen sind nach McCune et al. (1987) typische Anzeichen von Osteoarthritis und können ebenso wie Osteophyten und Enthesiophyten mittels Real-time - Sonographie nicht immer ausreichend dargestellt werden. Undeutliche und verschwommene Knorpelgrenzen machen die präzise Bestimmung der Erkrankungsstadien schwierig.

- Nadelsonde

Das Grundprinzip der Knorpeldickenmessung ist nach Jurvelin et al. (1995) die Änderung des Widerstandes bei Eindringen einer Metallnadel in den Knorpel und anschließendem Auftreffen auf die subchondrale Knochenplatte. Die Messeinheit ist so konstruiert, dass die Metallnadel mit gleichmäßiger Geschwindigkeit in die Probe vorgeschoben werden kann. Mit der Änderung des Widerstandes ändert sich die Kraft, die auf den Sensor aufgebracht werden muss. Die Kraft kann über einen Computer in Abhängigkeit vom Weg erfasst werden.

Nach Ansicht der Autoren ändert sich das Signal nur geringfügig, wenn die Nadel auf die Tidemark des Knorpels trifft. Die Grenze zwischen Knorpel und Tidemark wird bei dieser Methode daher eher subjektiv evaluiert.

- Magnetresonanztomographie (MRT)

Herberold et al. (1999) sowie Baldassarri et al. (2007) zeigen mit ihrer Untersuchung, dass die Messung der Knorpeldicke mittels Kernspintomographie eine genaue und sichere Methode darstellt. (s. Kap. 4.3). Anhand von bestimmten Algorithmen kann unabhängig von der Schnittrichtung des MRT die genaue Knorpeldicke bestimmt werden.

- Histologie

Frisbie et al. (2006) untersuchten die Knorpeldicke an Gewebeschnitten. Die HE – Färbung ermöglicht nach Frisbie et al. (2006) eine klare Trennung zwischen kalzifiziertem und nicht kalzifiziertem Knorpel. Die Fehlerquote liegt bei dieser Methode nach Pritzker et al. (2006) etwa bei 20 %, da Schrumpfungs- und Quellungsartefakte nicht mit erfasst werden können. Das Aufquellen des Knorpels entsteht nach Jurvelin et al. (1995) beim Schneiden bzw. Sägen der Knorpelproben, die Schrumpfungsartefakte sind durch die Aufbereitungsprozesse zu den histologischen Schnittpräparaten bedingt.

- Messlupe

Engl (2007) bestimmte die Knorpeldicke an Schnittpräparaten von gesunden equinen Tarsalknochen optisch mit einer Messlupe der Firma Peak® Japan. Diese Messlupe ist mit einer 0,05 mm genauen Skala ausgestattet. Für den medialen Trochleakamm lagen die Werte zwischen 0,78 - 0,92 mm, für den lateralen Rollkamm lag der Messbereich zwischen 0,75-1,08 mm. Die dabei ermittelte Standardabweichung lag zwischen 0,091 und 0,264.

Naredo et al. (2008) untersuchten die Knorpeldicke ebenfalls mit einer Messlupe an Schnittpräparaten von menschlichen Kniegelenken (s. Sonographie).

II. Material und Methoden

5. Tiermaterial

Untersucht wurde der Gelenkknorpel des Femoropatellar- und des Femorotibialgelenkes am distalen Femur von 15 euthanasierten Warmblutpferden. Insgesamt wurden 30 Gelenke untersucht.

Die verwendeten Kniegelenke stammen ausschließlich von adulten Tieren im Alter von 4 bis 16 Jahren mit einer Körpermasse von 450 – 600 kg, die auf Grund einer unheilbaren Erkrankung euthanasiert werden mussten. Es wurden 9 Wallache und 6 Stuten untersucht (s. Tab. 5). Vorberichtlich konnte bei den Pferden eine Erkrankung der Kniegelenke ausgeschlossen werden.

Pferd Nr.	Alter (Jahre)	Rasse	Geschlecht	Körpermasse (kg)
8	16	Wblt	Wallach	480
10	13	Wblt	Wallach	471
15	4	Wblt	Wallach	454
17	5	Wblt	Wallach	470
18	5	Wblt	Wallach	540
21	14	Wblt	Stute	569
24	10	Wblt	Stute	550
25	12	Wblt	Stute	573
26	9	Wblt	Stute	500
27	4	Wblt	Wallach	450
28	15	Wblt	Wallach	545
29	13	Wblt	Wallach	600
30	4	Wblt	Stute	550
31	5	Wblt	Stute	490
32	14	Wblt	Wallach	500

Tab. 5: Alter, Rasse, Geschlecht und Körpermasse der untersuchten Tiere

Von den euthanasierten Tieren wurden folgende Daten erhoben:

1. Alter, Rasse, Geschlecht, Körpermasse
2. Verwendungszweck
3. Anamnese
4. Erkrankung/Todesursache
5. Datum/Uhrzeit der Euthanasie
6. Prämedikation/Medikamente der Euthanasie

6. Geräte und Untersuchungsverfahren

6.1. Präparation des distalen Femur

Innerhalb der ersten 48 Stunden post mortem erfolgte die Präparation der Kniegelenke. Der Oberschenkelknochen wurde im distalen Drittel abgesetzt, Kollateralbänder, Kniescheibenbänder sowie das Ligamentum femoropatellare laterale und mediale sind mit einem Skalpell durchtrennt worden.

6.2 Makroskopische Untersuchung des distalen Femur

In die vorliegende Studie wurden nur Pferde mit makroskopisch unauffälliger Knorpelbeschaffenheit (Collins-Grade 0, Tab. 3) einbezogen. Unmittelbar nach Charakterisierung des Arthrosestatus wurde die gesamte Knorpeloberfläche mit in GBSS-Puffer (Fa. Sigma-Aldrich, München) getränkten Kompressen bedeckt und somit feucht gehalten. Der GBSS-Puffer enthält Proteaseinhibitoren und dient dazu, die proteolytische Aktivität zu minimieren. Die so aufbereiteten Knochenteile wurden wie von Engl (2007, 2008) beschrieben bei -20° Celsius für maximal 6 Monate eingefroren.

6.3 Gerät zur Messung der Knorpelsteifigkeit

Für die vorliegende Studie wurde ein von der Arbeitsgruppe Lyyra weiterentwickeltes Indentermessgerät (Artscan® 200, Artscan medical innovations, Kuopio) verwendet. Artscan® besteht aus einer autoklavierbaren Messsonde sowie einem Geräteteil inklusive Rechner und Monitor (Abb. 12).

Die Datenerfassung und Aufzeichnung erfolgte mit dem Computerprogramm Artscan® 200 Version 1.0 verwendet.

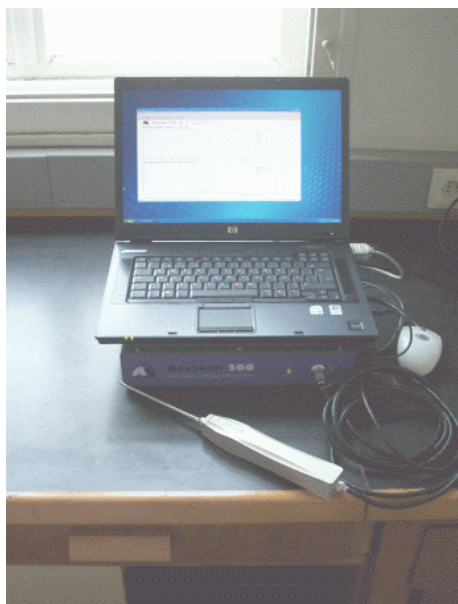


Abb. 12: Artscan® 200 Messsystem

Die Messsonde besteht aus rostfreiem Stahl, welche gewaschen und bei 120° Grad Celsius autoklaviert werden kann. Daher ist sie auch intra vitam bei Arthroskopien einsetzbar. Sie besteht aus einem 13 cm langen Stab mit 4,5 mm Durchmesser, der an einem Handstück befestigt ist (Abb. 13). Am Ende des Messstabes befindet sich eine um 20° Grad abgeschrägte ebene Fläche, die Referenzplatte genannt wird. In deren Mitte und 0,1 mm über dieser erhaben befindet sich der konvex geformte Indenter mit einem Durchmesser von 0,7 mm. (Abb. 14).



Abb. 13: Artscan® 200 Messsonde

Die Messsonde enthält in ihrem Inneren ein Biegeelement, welches mit dem Indenter verbunden ist. Die Kraft, die auf den Indenter einwirkt, wird durch zwei Dehnungsmessstreifen registriert, die sich gegenüberliegen. Um die axial einwirkenden Kräfte zu eliminieren, sind diese Dehnungsmessstreifen mit einer Wheatstone'schen Brücke verschaltet. Es werden also nur die parallel zum Dehnungsmessstreifen einwirkenden Kräfte aufgezeichnet. Ebenso können dadurch auch temperaturbedingte Verformungen des Materials ausgeschlossen werden.

Ebenfalls wird an der Referenzplatte nach dem gleichen Prinzip die durch den Untersucher aufgebrachte Kraft durch zwei Dehnungsmessstreifen gemessen. Die Auslenkung des an den Indenter angeschlossenen Biegelements misst die Widerstandskraft (Knorpelsteifigkeit) des untersuchten Materials.

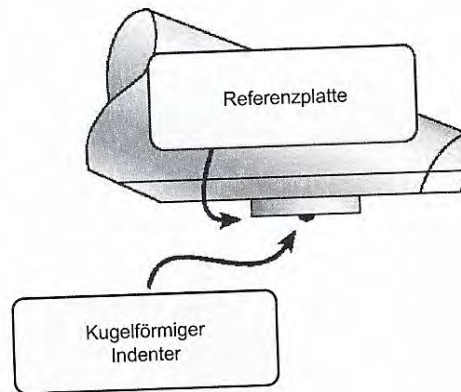


Abb. 14: Referenzplatte und Indenter (vorderes Ende der Messsonde)

Sowohl bei in vivo als auch bei in vitro Messungen muss durch den Untersucher eine konstante, parallel auf den Knorpel abgegebene Kraft ausgeübt werden. Der Messzapfen erzeugt hierbei eine Deformation des Knorpels von 100 μm , da das innen liegende Biegeelement wesentlich steifer als Knorpel ist.

6.3.1 Messungen der Knorpelsteifigkeit

Durchführung

Ca. 12 Stunden vor der Messung wurde der zu untersuchende distale Femur, vollständig in isotoner Kochsalzlösung eingetaucht und über Nacht bei 8° Celsius aufgetaut.

Anhand eines Rasters (Abb. 15) wurde die Gelenkfläche am distalen Femur in insgesamt 8 Segmente eingeteilt. In jedem Segment wurde an drei unterschiedlichen Messpunkten die Knorpelsteifigkeit bestimmt. Die Messpunkte lagen direkt axial auf dem Scheitelpunkt des medialen („F“) und lateralen Rollkammes („B“) sowie jeweils abaxial an den Flanken. Zusätzlich wurden insgesamt 2 weitere Messpunkte im Bereich der Trochlea ossis femoris untersucht (D).

Pro Femurkondylus wurden jeweils 6 weitere Messpunkte für die Untersuchung verwendet. 3 Messpunkte befanden sich im kranialen Bereich des Femurkondylus, die anderen 3 im kaudalen Areal.

Von lateral beginnend wurden die Messpunktlinien an den linken und rechten Femurgelenkflächen von A-G gekennzeichnet. Von proximal nach distal wurden die Reihen von 1-4 beziffert (Abb. 15).

Es ergaben sich somit für eine Femurepiphyse 26 Messpunkte zur Knorpelsteifigkeitsmessung.

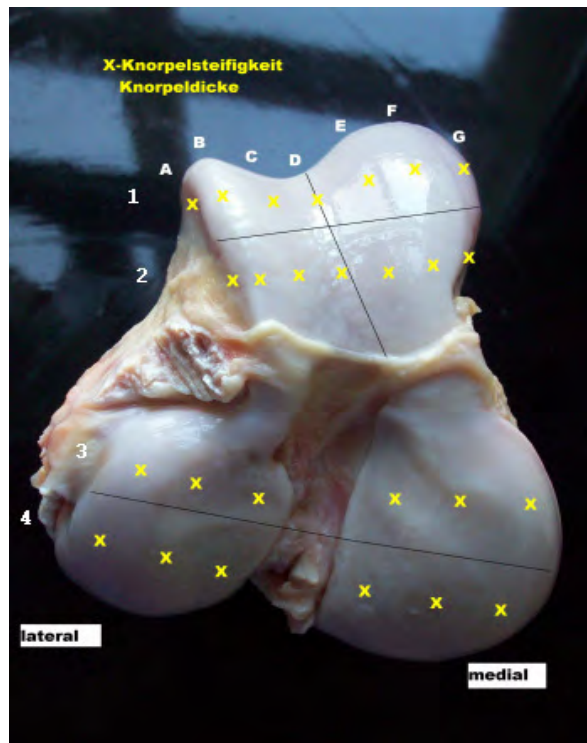


Abb. 15: 26 Messpunkte zur Knorpelsteifigkeits- und Knorpeldickenmessung am rechten Femur

Die Messpunkte wurden jeweils mit einem schwarzen Textilmarker (Edding® 4500, Nürnberg) markiert.

Der Messvorgang gliederte sich entsprechend den Empfehlungen von Jurvelin et al. (2009) in 2 Durchgänge. Im ersten Durchgang wurde die Messsonde mit einer konstanten Kraft von jeweils 3 Newton 2 Sekunden lang orthograd zur Knorpeloberfläche auf einem der markierten Messpunkte platziert. Danach ist die Messung an derselben Stelle im Abstand von 5 Sekunden wiederholt worden. Zwischen den beiden Messungen wurde die Sonde vollständig vom Knorpel abgesetzt.

In Abb. 16 ist eine Messung zur Knorpelsteifigkeit exemplarisch dargestellt:

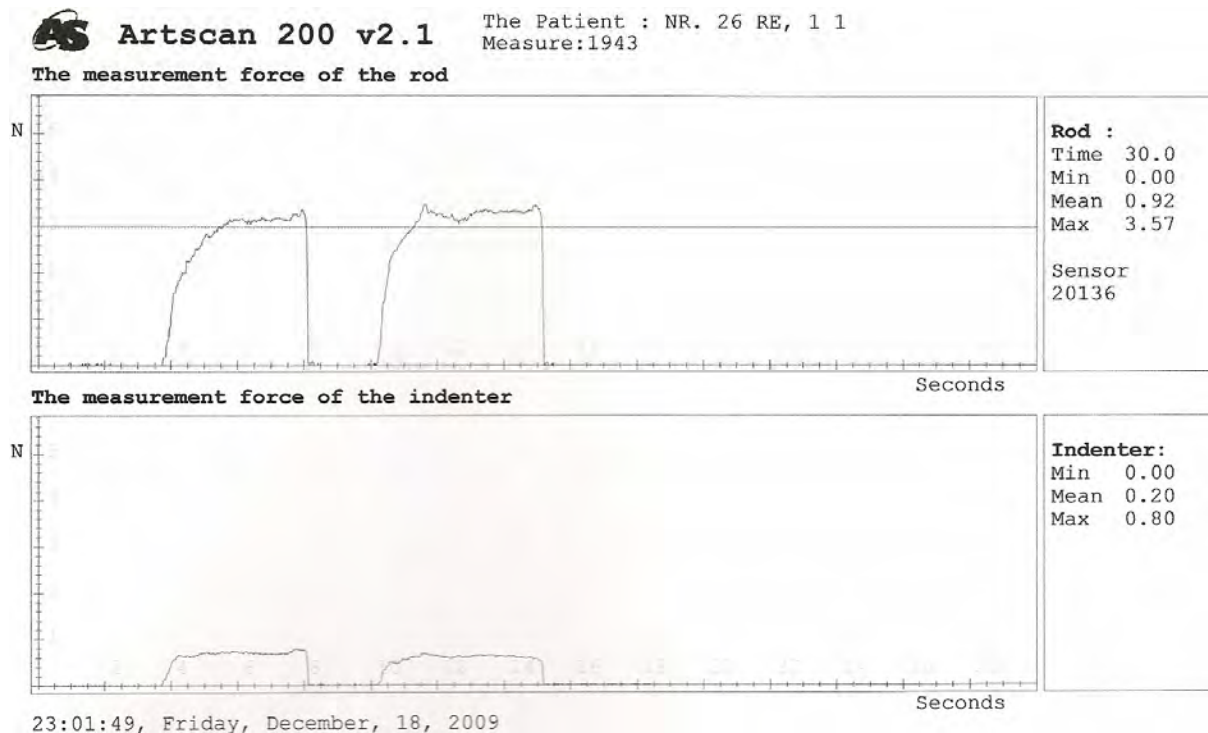


Abb. 16: Monitorbild des Programms Artscan (Artscan Benutzerhandbuch, Seite 18)

Das obere Diagramm (The measurement of the rod = die durch das Biegeelement gemessene Kraft) zeigt die Druckkraft in Newton (N) an, die der Untersucher auf das Untersuchungsmaterial ausübt. Die Zeit für den Untersucher ist auf der x-Achse aufgetragen.

Das untere Diagramm (The measurement of the indenter = durch die Messsonde gemessene Kraft) zeigt die Widerstandskraft an, die das Untersuchungsmaterial entgegen der Messsonde leistet.

Anschließend erfolgten die Messungen an den anderen Messpunkten. Während den Messungen ist die Knorpeloberfläche circa alle 5 Minuten mit isotoner Kochsalzlösung verdünnt mit Gey's balanced salt solution (GBSS-Puffer, Sigma-Aldrich®, München) befeuchtet worden, um eine Dehydratation des Knorpels zu verhindern.

Das 2. Messintervall gestaltete sich wie das vorherige. Somit ergaben sich zur Knorpelsteifigkeit insgesamt 4 Messwerte pro Messpunkt. Für die Auswertung wurde der Mittelwert aus den jeweiligen 4 Messwerten verwendet.

6.4 Gerät zur Messung der Knorpeldicke

Für die sonographische Untersuchung wurde das Real - Time Ultraschallgerät LOGIQ TM 500 PRO Series GE Medical Systems, Milwaukee, Wisconsin (USA) verwendet. Zur Bestimmung der Knorpeldicke kam ein Linearschallkopf vom Typ 739L (Abb. 17) zum Einsatz. Die Untersuchungs-Frequenz betrug 9 MHz.



Abb. 17: Linearschallkopf vom Typ 739L zur Messung der Knorpeldicke

Für die Studie wurde eine Vorlaufstrecke verwendet. Ein Kontaktgel ermöglichte eine luftfreie Ankopplung des Schallkopfes an die Knorpeloberfläche.

6.4.1 Messung der Knorpeldicke

Durchführung:

Die Messpunkte für die Knorpeldicke sind mit den Messpunkten zur Knorpelsteifigkeit identisch (Abb. 15). Daraus ergeben sich ebenfalls 26 Messpunkte zur Knorpeldicke pro distaler Femur.

Die Knorpeldicke wird definiert als der im Schallbild (Abb. 18) gemessene Abstand zwischen der Knorpeloberfläche und der hyperechogenen Reflexzone des subchondralen Knochens.

An jedem Messpunkt wurden insgesamt 3 Messungen durchgeführt. Insgesamt erfolgten 2340 Messungen zur Knorpeldicke. Berücksichtigt wurden die Werte für die Knorpeldicke nur, wenn der Knorpelrand sowie die Grenze zum hyperechogenen subchondralen Knochen scharfrandig und eindeutig definierbar waren.



Abb. 18: *Ultraschallbild von Pferd Nr. 16, linkes Knie zur Darstellung und Bestimmung der Knorpeldicke*

6.5 Probenentnahme zur Bestimmung des Glykosaminoglykan- und Kollagengehaltes

An 10 verschiedenen Messpunkten (Abb. 19) wurden jeweils im direkten Anschluss an die Knorpelsteifigkeits- und Knorpeldickenmessung Proben zur quantitativen Glykosaminoglykan- und Kollagenbestimmung entnommen.

Die Entnahme erfolgte mit einer Knorpel-Knochenstanze (*Smith & Nephew, Marl*). Der Durchmesser eines ausgestanzten Knorpel-Knochenzylinders beträgt 4,5 mm (Abb. 20).

Nach Entnahme der Knorpel - Knochenzylinder wurden diese jeweils in ein Eppendorfgefäß (Roth®, Karlsruhe) mit GBSS-Puffer (Sigma-Aldrich®, München) verbracht und bei -20° Celsius eingefroren.

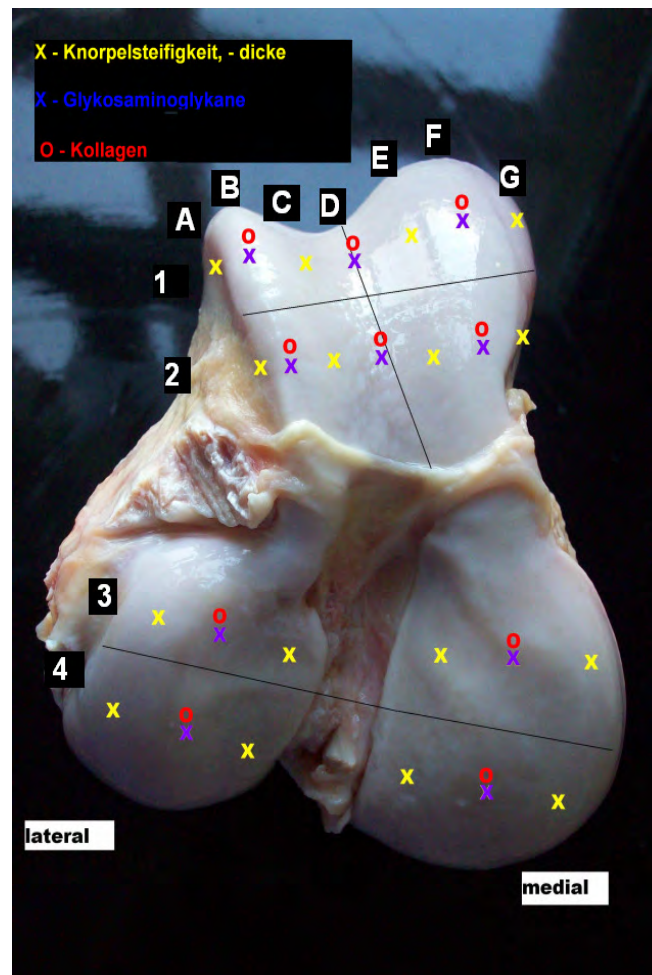


Abb. 19: Lokalisation der einzelnen Messpunkte zur Bestimmung des Glykosaminoglykan- und Kollagengehaltes im hyalinen Gelenkknorpel

(X - Knorpelsteifigkeit -dicke; X - Glykosaminoglykane; O - Kollagen)



Abb. 20: Probenentnahme zur Bestimmung des Glykosaminoglykanglykan- und Kollagengehaltes mit einer Knorpel-Knochenstanze (Smith&Nephew, Marl; Durchmesser: 4,5 mm)

6.6 Bestimmung des Glykosaminoglykangehaltes

Die Bestimmung des Glykosaminoglykangehaltes erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Giessen und Marburg GmbH, Labor für Experimentelle Orthopädie und wurde in den Laborräumen des Institutes durchgeführt. An 10 verschiedenen Messpunkten eines Kniegelenkes wurde bei insgesamt 15 Pferden (300 Messpunkte) die quantitative Glykosaminoglykanbestimmung durchgeführt. Diese 10 Messpunkte waren identisch zu 10 Messpositionen von Knorpelsteifigkeit und Knorpeldicke („B“, „F“, „D“) (Abb. 19).

Dieser photometrische Assay (DMMB-Assay) beruht auf dem *Verfahren nach Farndale* (Farndale et al. 1982) und ermittelt quantitativ den Gehalt an sulfatierten Glycosaminoglykanen in der extrazellulären Knorpelmatrix. Die Glycosaminoglykane bilden mit Ethanol und Dimethylmethylenblau-hydrochlorid (DMMB) einen blauen Farbkomplex, dessen Absorption photometrisch messbar ist.

Reagenzien:1,9-Dimethylmethylenblau-Lösung (Serva Nr. 20335):

- 16 mg Farbstoff
- 5ml Ethanol
- 2ml Formiatpuffer (pH 3,5)
- ad 1000ml Aqua dest.

Verdauungspuffer:

- 0,2ml 0,5 M Natriumacetat-Puffer, pH 5,8
- 330µl Papainlösung (100 mg/ml von Boehringer Mannheim, Nr. 108014)
- 1,767 ml Aqua dem.
- 2,0 mg Cystein/HCL (Sigma-Aldrich, MünchenNr. C1276)
- Chondroitin-4-sulfat Standard (100µg/ml) (Sigma-Aldrich, München Nr. C 8529)

Nach Auftauen der Knorpel – Knochenzylinder ist der Knorpel mit Hilfe einer Einmalskalpellklinge vom Knochen getrennt worden. Die Knorpelmasse der Gewebeprobe wurde bestimmt und anschließend wurden die Knorpelproben enzymatisch mit Papain verdaut, um die Glycosaminoglykane aus der Knorpelmatrix zu lösen und für die Messung zugänglich zu machen. Die Inkubation mit 600 µl Verdauungspuffer für jede Knorpelprobe erfolgte 16 Stunden bei 60°C.

Nach dem Abkühlen wurden die Proben 10 Minuten bei 10.000 g und 4°C in einer Eppendorf-Kühlzentrifuge (eppendorf advantage 541 5R, Fa. AL-Labortechnik, Amstetten) zentrifugiert (Abb. 21).



Abb. 21: Eppendorf-Kühlzentrifuge (eppendorf advantage 541 5R, Fa. AL-Labortechnik, Amstetten)

Der Probenüberstand ist jeweils 1:64 mit Aqua bidest verdünnt worden. Davon wurden 3x25 μ l (Triplikate) abgenommen, jeweils in eine 96-Well Platte pipettiert und mit 250 μ l DMMB-Lösung überschichtet (Abb. 22).

Die Auslesung der Messergebnisse erfolgte mit einem ELISA-Photometer (Dynatech Microplate Reader Model MR 5000, Fa. Dynatech Laboratories, Chantilly, USA) bei einer Wellenlänge von 523nm.

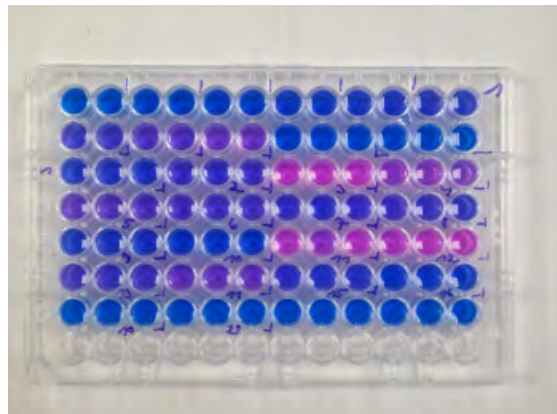


Abb. 22: Photometrische Bestimmung des Glykosaminoglykangehaltes; Probenüberstand in einer 96 - Well Platte mit 250 μ l DMMB - Lösung überschichtet

Zur Erstellung einer Standardkurve war vorab eine Verdünnungsreihe mit Chondroitin-4-Sulfat nötig. Rechnerisch lässt sich anhand des Steigungsdreiecks der Glykosaminoglykgehalt der gemessenen Knorpelproben in $\mu\text{g}/\text{ml}$ ermitteln (Abb. 23). Für jedes Pferd wurde pro 96 – Well Platte eine individuelle Standardkurve bestimmt.

Werden die mittels ELISA – Photometer ermittelten Werte zur optischen Dichte als x-Variable in die lineare Gleichung (Abb. 23) eingesetzt, erhält man als y-Variable den Glykosaminoglykgehalt in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Knorpel.

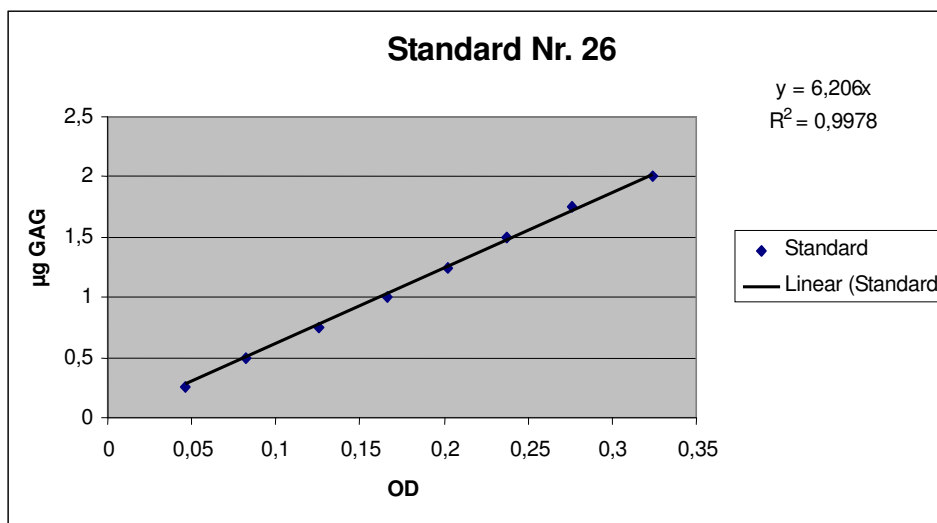


Abb. 23: Standardkurve DMMB-Assay zur Ermittlung des Glykosaminoglykgehaltes in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Knorpel bei Pferd Nr. 26 (OD = optische Dichte; μg GAG = Glykosaminoglykgehalt in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Knorpel)

6.7 Bestimmung des Kollagengehaltes

Die Bestimmung des Kollagengehaltes erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biochemie und Endokrinologie des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität in Giessen und wurde in den Laborräumen des Institutes durchgeführt.

An ebenfalls 10 verschiedenen Messpunkten (Abb. 19) eines Femurs wurde bei insgesamt 15 Pferden (300 Messpunkte) die quantitative Hydroxyprolinbestimmung durchgeführt. Aus diesen Werten wurde der quantitative Kollagengehalt errechnet.

Durch Säurehydrolyse von organischem Material ist es möglich, den Gehalt der Aminosäure Hydroxyprolin quantitativ zu bestimmen und daraus den Gesamtkollagengehalt zu errechnen.

Der Hydroxyprolingehalt wird nach dem Verfahren von Woessner (1961) in einer modifizierten Art nach Stegemann und Stalder (1967) ermittelt.

Eine Probe, von der angenommen wird, dass sie Kollagenbestandteile enthält, wird zunächst in Anwesenheit von halbkonzentrierter Salzsäure (6 mol/l) bei 105°C hydrolysiert, um die vorhandenen Proteinbestandteile in ihre Aminosäuren zu zerlegen.

In mehreren Schritten wird eine für die Aminosäure Hydroxyprolin spezifische Färbereaktion durchgeführt:

Hydroxyprolin wird durch Chloramin T schrittweise über Pyrrolincarboxylsäure und Pyrrol-2-Carbonsäure zu Pyrrol oxidiert. In Kombination mit p-Dimethylaminobenzaldehyd entsteht ein sogenanntes Chromophor, welches sein Absorptionsmaximum bei 565 nm hat.

Über diese Farbreaktion kann der Hydroxyprolingehalt anschließend per Extinktionsmessung bei 540 nm mit einem Photometer bestimmt und in den Gehalt an Kollagen umgerechnet werden.

Reagenzien:

- HCL (Roth®, Karlsruhe, 6 mol/l)

- Methanol (Roth®, Karlsruhe)

- Workingsolution-Hydroxyprolin (100 µg/ml): Herstellung: 1mg/ml Hydroxyprolin-Lösung (Fa. Sigma-Aldrich®, München) in 100 ml 50% Isopropanol, bei -20°C aufbewahren, 1:10 verdünnt in 50% Isopropanol

- Isopropanol 50% (Fa. Fisher Scientific®, UK)

- 0,6% Chloramin-T-Lösung: Herstellung: 300 mg Chloramin T (Fa. Sigma-Aldrich®, München), 50 ml Puffer B

- Puffer A: 3,4 g NaOH, 3,4 g Citronensäure monohydrat, 12 g Natriumacetat trihydrat, pH 6,0 einstellen (mit Essigsäure), ad 100 ml aqua dest.

- Puffer B: 60 ml Isopropanol, 33 ml aqua dest., 39 ml Puffer A

- Ehrlich's Reagenz-Lösung: 3 g Ehrlichs-Reagenz (Dimethylamino-benzaldehyd, Sigma-Aldrich®, München), 26 ml Isopropanol, 8 ml 50% Perchlorsäure

An den gewonnenen Knorpel – Knochen – Zylindern wurde der Knorpel mit Hilfe einer Einmalskalpellklinge vom Knochen getrennt und die Knorpelmasse zur späteren Bestimmung des Hydroxyprolinegehaltes gewogen. Die Knorpelproben wurden in 6 N HCL aufgenommen und bei 110°C über 16 Stunden hydrolysiert.

Nach dem Abkühlen erfolgte die Filtration der hydrolysierten Proben durch einen Spritzenfilter (Sartorius, Minisart SRP 4 17820, Göttingen).

Aus dem Überstand sind 3 x 15 µl (Triplikate) in ein Eppendorfgefäß pipettiert worden. Zu jeder Probe wurden jeweils 30 µl Methanol dazugegeben. Im Anschluss fand das Abdampfen des Methanols durch Stickstoff in einer speziell dafür vorgesehen Konstruktion statt (Abb. 24).



Abb. 24: Einengung der Proben unter Stickstoff in einer Reacti-Vap® Evaporating unit (Fa. Pierce Chemical Company, Box 117, Rockford IL 61105, USA)

Das so entstandene Kristallat wurde wieder in 50% igem Isopropanol gelöst. Zu jeweils 50 µl Probe sind 100 µl der 0,6% igen Chloramin-T- Lösung pipettiert worden. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur, erfolgte die Hinzugabe von 100 µl frisch zubereiteter Ehrlich's Reagenz-Lösung.

Nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten bei 50°C konnte die Absorption bei 540 nm Wellenlänge mit einem ELISA-Photometer (Dynatech Microplate Reader Model MR 5000, Dynatech Laboratories, Chantilly, USA) gemessen werden.

Der lineare Zusammenhang zwischen Konzentration und Extinktion zur Hydroxyprolinbestimmung mittels spektrophotometrischer Messung kann anhand einer Eichkurve dargestellt werden. Hierfür wird eine definierte verdünnte Hydroxyprolinlösung (Hydroxyprolinstandard) verwendet (Abb. 25). Der Hydroxyprolingehalt in µg/mg Knorpel berechnet sich anhand einer linearen Gleichung (Abb. 25), analog zur Proteoglykanbestimmung.

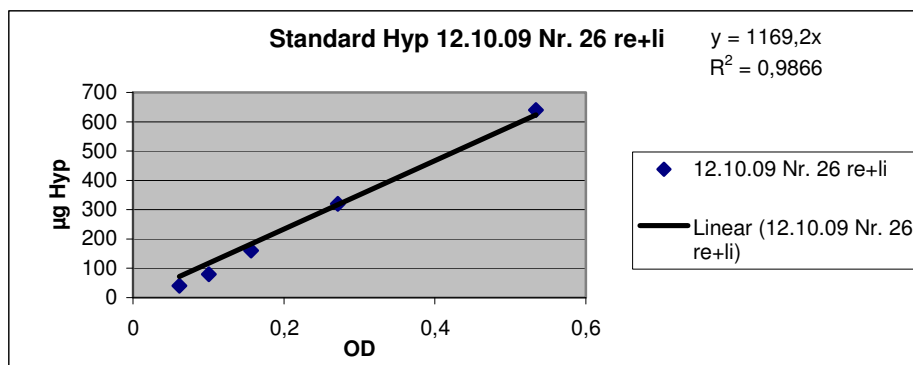


Abb. 25: Eichkurve Hydroxyprolinstandard zur Bestimmung des Hydroxyprolingehaltes in µg/mg Knorpel bei Pferd Nr. 26, bestimmt am 12.10.09(Legende analog Abb. 23)

Nach Appleyard et al. (2003) sowie Temple-Wong et al. (2009) beträgt der Hydroxyprolinanteil 13,5-14 % des Kollagengehaltes im Gelenkknorpel. Zur Berechnung des Kollagengehaltes wurden die ermittelten Hydroxyprolinwerte mit dem Faktor 7,4 multipliziert.

7. Auswertung und Biometrie

Die statistischen Datenanalysen erfolgten in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die statistischen Auswertungen wurden unter Verwendung des Statistikprogrammpakets BMDP 2/ Dynamic, Release 8.1 (BMDP Statistical Software, Los Angeles, CA), durchgeführt. Bei der Bewertung der statistischen Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ zugrunde gelegt, d.h. Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Zusätzlich wird, wenn möglich, der exakte p-Wert angegeben. Der p-Wert (auch Überschreitungswahrscheinlichkeit oder Signifikanzwert genannt) ist eine Kennzahl zur Auswertung statistischer Tests. Dieser Wert gibt an, wie glaubhaft ein Stichprobenergebnis ist, wenn die Nullhypothese wahr ist.

7.1 Statistische Auswertung der Messwerte Knorpelsteifigkeit und Knorpeldicke bzw. Kollagen und Glykosaminoglykane bezüglich der Lokalisationen

Zur statistischen Prüfung der abhängigen Parameter Knorpelsteifigkeit und -dicke sowie Kollagen und Glykosaminoglykanen wurde bei den unabhängigen Merkmalen Seite, Reihe und Position eine dreifaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Aufgrund der unregelmäßigen Messpunktverteilung (D1 und D2 nur in Reihe 1 und 2 vorhanden), erfolgte die statistische Auswertung zunächst für die Reihen 1-4 ohne die beiden Positionen D1 und D2. In einer weiteren statistischen Analyse wurden nur die Reihen 1 und 2 mit der Position D1 und D2 zusätzlich berücksichtigt. Untersucht wurden außerdem die paarweisen Wechselwirkungen zwischen Seite, Reihe und Position.

7.2 Vergleich von Knorpelsteifigkeit und -dicke zwischen lateralen und medialen Gelenkarealen

Die Knorpeldicke und die Knorpelsteifigkeit wurden rechnerisch analysiert und getrennt nach den Richtungen lateral und medial sowie nach Reihe 1 und Reihe 2 bzw. Reihe 3 und Reihe 4 betrachtet. Für die Untersuchung wurde eine vierfaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung bezüglich der Faktoren Seite, Reihe, Position und Richtung angewendet.

7.3 statistische Auswertung zur Messmethodik des Parameters Knorpelsteifigkeit

Der Einfluss einer wiederholten Messung der Knorpelsteifigkeit am selben Messpunkt wurde durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse zwischen 1. und 2. bzw. 3. und 4. Messung sowie zwischen 1. und 2. Durchgang untersucht. Um nachzuweisen, ob die Knorpeldicke bezogen auf die einzelnen Positionen quantitativen Einfluss auf die Knorpelsteifigkeitswerte hat, wurde der gepoolte Regressionskoeffizient bei der Untersuchung berücksichtigt.

In einer nachträglichen Untersuchung wurde die Veränderung zwischen Messung 1 und Messung 3 ebenfalls anhand einer zweifaktoriellen Varianzanalyse durchgeführt.

7.4 Korrelation zwischen den Parametern Knorpelsteifigkeit, Knorpeldicke, Glykosaminoglykan- und Kollagengehalt

Mögliche Zusammenhänge zwischen den Merkmalen Knorpeldicke, Knorpelsteifigkeit, Glykosaminoglykane und Kollagen sowie zwischen der Knorpeldicke und der Körpermasse wurden unter Verwendung des Statistikprogramms BMDP6D/ Dynamic Release 8.1 (BMDP Statistical Software, Los Angeles, CA) mittels Korrelations- bzw. Regressionsanalysen geprüft. Bei der Korrelationsanalyse zwischen Körpermasse und Knorpeldicke wurde der Einfluß der Körpermasse auf den Gesamtmittelwert der Knorpeldicke (mKD) je Tier (N=30) getestet.

III. Ergebnisse

8.1. Ergebnisse zur Knorpelsteifigkeit am distalen Femur

Die Knorpelsteifigkeit am rechten Knie schwankt zwischen 0,264 N am Punkt E4 (kaudaler Bereich des medialen Femurkondylus) und 1,065 N am Punkt A1 (abaxial im proximalen Bereich des lateralen Rollkamms) (Tab. 6).

Auffallend für das linke Knie ist, dass der Minimalwert von 0,202 N ebenfalls am Punkt E4 (kaudaler Bereich des medialen Femurkondylus) sowie der Maximalwert von 0,834 N an der Position A1 (abaxial im proximalen Bereich des lateralen Rollkamms) auftreten (Tab. 7).

In den Abb. 26/27 sind die Mittelwerte zur Knorpelsteifigkeit am rechten/linken Kniegelenk bei 15 Pferden nach den einzelnen Positionen geordnet graphisch dargestellt.

Es sind auf beiden Seiten deutliche Unterschiede bei den Positionen A-G zu erkennen. Beide graphischen Darstellungen (Abb. 26/27) zeigen einen „wannenförmigen“ Verlauf, das heißt von Position A nach D (vom lateralen Rollkamm zur Trochlea ossis femoris hin) nimmt die Knorpelsteifigkeit ab und nach G hin (von der Trochlea ossis femoris bis zum medialen Rollkamm) wieder zu.

Der Blick in die Daten zeigt, dass außer an Position B (axial auf dem Scheitel des lateralen Rollkammes) generell von Reihe 1 nach Reihe 4 eine Abnahme der Knorpelsteifigkeit festzustellen ist. Im Femoropatellargelenk befinden sich also die höchsten Werte zur Knorpelsteifigkeit. In Position B (axial auf dem Scheitel des lateralen Rollkammes) jedoch sind die Messwerte zur Knorpelsteifigkeit in den verschiedenen Reihen nahezu gleich.

Messpunkte der Knorpelsteifigkeit 15 Pferde rechtes Knie			Mittelwerte in Newton	Standardabweichung
Verlauf	Position	Reihe		
latero-medialer Verlauf	A	1	1,065	0,347
		2	0,731	0,186
		3	0,634	0,149
		4	0,568	0,137
	B	1	0,503	0,087
		2	0,481	0,091
		3	0,519	0,095
		4	0,533	0,097
	C	1	0,433	0,081
		2	0,396	0,082
		3	0,364	0,047
		4	0,344	0,070
	D	1	0,318	0,068
		2	0,275	0,080
		3	x	x
		4	x	x
	E	1	0,596	0,125
		2	0,518	0,051
		3	0,312	0,074
		4	0,264	0,065
	F	1	0,618	0,051
		2	0,532	0,081
		3	0,385	0,107
		4	0,359	0,065
	G	1	0,670	0,127
		2	0,632	0,205
		3	0,492	0,070
		4	0,472	0,080

Tab. 6: Übersicht der Mittelwerte zur Knorpelsteifigkeit (in N) mit Standardabweichung am rechten Knie bei 15 Pferden (die Minimal- und Maximalwerte sind hervorgehoben)

Messpunkte der Knorpelsteifigkeit 15 Pferde linkes Knie			Mittelwerte in Newton	Standardabweichung
Verlauf	Position	Reihe		
latero - medialer Verlauf	A	1	0,834	0,204
		2	0,724	0,176
		3	0,598	0,071
		4	0,532	0,060
	B	1	0,469	0,083
		2	0,460	0,118
		3	0,486	0,084
		4	0,528	0,073
	C	1	0,415	0,100
		2	0,379	0,055
		3	0,382	0,067
		4	0,318	0,056
	D	1	0,327	0,055
		2	0,269	0,060
		3	x	x
		4	x	x
	E	1	0,566	0,107
		2	0,532	0,088
		3	0,294	0,061
		4	0,202	0,073
	F	1	0,558	0,080
		2	0,492	0,057
		3	0,337	0,072
		4	0,372	0,068
	G	1	0,621	0,187
		2	0,747	0,366
		3	0,505	0,085
		4	0,452	0,067

Tab. 7: Übersicht der Mittelwerte zur Knorpelsteifigkeit mit Standardabweichung (in N) am linken Knie bei 15 Pferden (die Minimal- und Maximalwerte sind hervorgehoben)

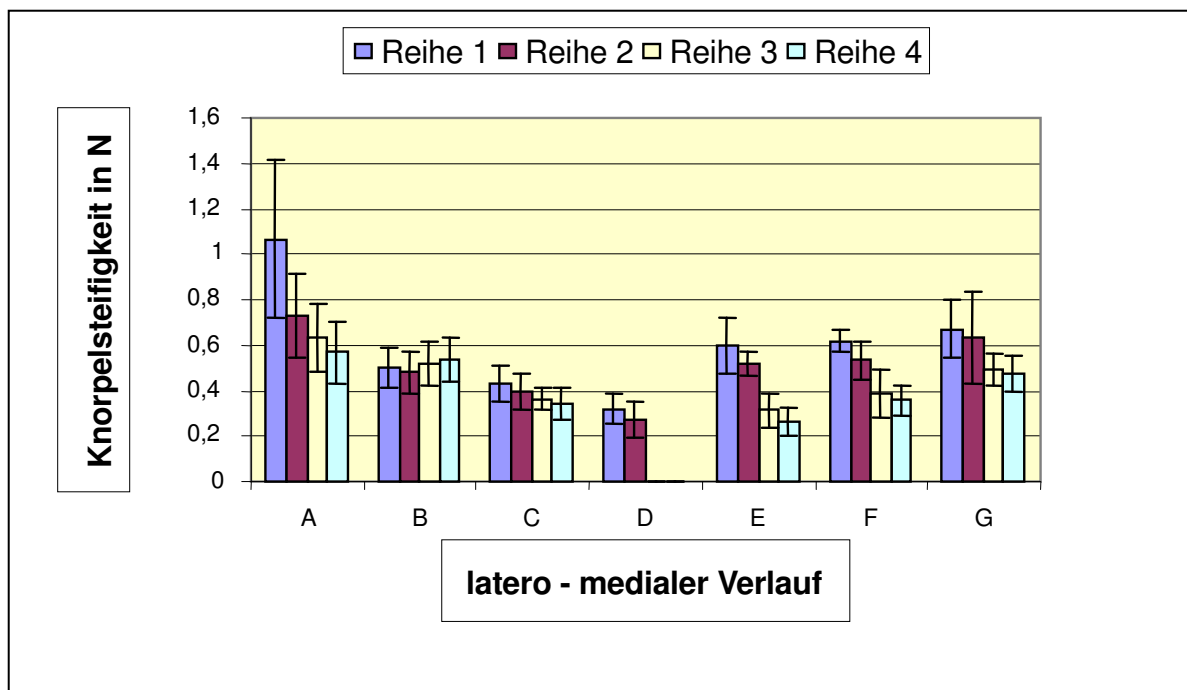


Abb. 26: Mittelwerte zur Knorpelsteifigkeit in Newton mit Standardabweichung am rechten Knie bei 15 Pferden; nach Positionen geordnet

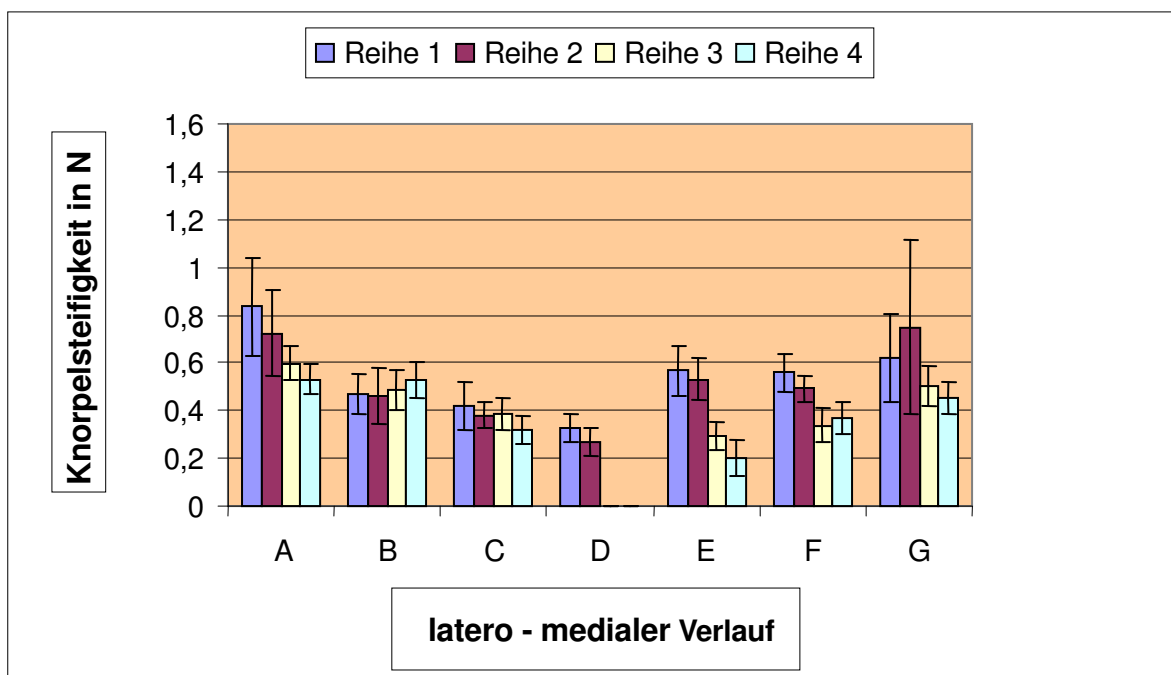


Abb. 27: Mittelwerte zur Knorpelsteifigkeit in Newton mit Standardabweichung am linken Knie bei 15 Pferden; nach Positionen geordnet

8.1.1 Ergebnisse zum Seiten-, Reihen- und Positionsvergleich der Knorpelsteifigkeit an den verschiedenen Messpunkten (Tab. 8)

Anhand einer dreifaktoriellen Varianzanalyse wurde die Beziehung zwischen der Knorpelsteifigkeit und den Messpunkten bezüglich der unabhängigen Merkmale Seite, Reihe und Position durchgeführt (Kap. 7.1).

Seitenvergleich:

Untersucht wurde der globale Seitenunterschied. Dabei wurden die Mittelwerte globaler Art zwischen links und rechts miteinander verglichen. Da der p-Wert für den Mittelwert aus allen 4 Knorpelsteifigkeitsmessungen $>0,05$, bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Seiten. Die Berücksichtigung der Position D (Trochlea ossis femoris) verändert den p-Wert nicht.

Reihen- und Positionsvergleich:

Bei der statistischen Auswertung der Mittelwerte zur Knorpelsteifigkeit wurden jeweils mit einem p-Wert $<0,05$ gemittelt über beide Seiten signifikante Unterschiede zwischen den Reihen und den Positionen festgestellt. Die Position D (Trochlea ossis femoris) verändert die signifikanten Unterschiede nicht.

Wechselwirkungen:

Untersucht wurden außerdem die paarweisen Wechselwirkungen zwischen Seite, Reihe und Position. Mit dem Mittelwert der 4 Knorpelsteifigkeitsmessungen ($p = 0,033$) ergeben sich statistisch signifikante Wechselwirkungen zwischen Seite und Reihe. Das bedeutet, dass die Unterschiede zwischen den Reihen 1-4 links und rechts nicht genau gleich sind. Werden die Positionen D1 und D2 berücksichtigt, sind die Werte für den Mittelwert mit $p = 0,003$ ebenfalls statistisch signifikant.

Die Wechselwirkung zwischen Seite und Position führt mit dem Mittelwert der 4 Knorpelsteifigkeitsmessungen ($p = 0,076$) zu einem nicht signifikanten Zusammenhang. Es bestehen also im Seitenvergleich keine Unterschiede zwischen den Positionen. Werden die Positionen D1 und D2 berücksichtigt, bleiben die Zusammenhänge nicht signifikant ($p = 0,071$).

Die am deutlichsten signifikante paarweise Wechselwirkung mit $p = 0,0001$ für den Mittelwert aus 4 Knorpelsteifigkeitswerten ist beim Vergleich zwischen Reihe und Position entstanden. Dies besagt, dass die Unterschiede zwischen den Reihen gemittelt über die linke und rechte Seite positionsabhängig sind.

		Haupteffekte			Wechselwirkungen		
Messgröße	Messung	Seite	Reihe	Position	Seite-Reihe	Seite-Position	Reihe-Position
<i>KS ohne D</i>	m=Ø	p= 0,09	p= 0,0001	p= 0,0001	p= 0,033	p= 0,076	p= 0,0001
<i>KS mit D</i>	m=Ø	p= 0,23	p= 0,002	p= 0,0001	p= 0,003	p= 0,071	p= 0,0001

Tab. 8: p-Werte zur Knorpelsteifigkeit (KS) ohne/mit Position D mit den Haupteffekten Seite, Reihe, Position sowie den Wechselwirkungen Seite-Reihe, Seite-Position, Reihe-Position; die signifikanten p-Werte ($\leq 0,05$) sind hervorgehoben

8.1.2 Ergebnisse zum Vergleich der Knorpelsteifigkeit zwischen lateral und medial

Anhand einer vierfaktoriellen Varianzanalyse wurden die Mittelwerte zur Knorpelsteifigkeit getrennt nach lateral und medial betrachtet. In Reihe 1 und 2 liegen mit $p = 0,339$ keine Unterschiede zwischen lateral und medial vor. Dieses Ergebnis wird gemittelt über die Seite, Reihe und sämtliche Positionen betrachtet. Betrachtet man dagegen Reihe 3 und 4 sind die Richtungsunterschiede mit $p = 0,0001$ signifikant. Dies bedeutet, im Bereich des lateralen Femurkondylus ist die Knorpelsteifigkeit größer als medial. In den Abb. 28 und 29 sind die Knorpelsteifigkeitswerte am rechten und linken Knie nach den Reihen geordnet aufgeführt. In beiden Graphiken lassen sich die Unterschiede zwischen lateral und medial in der Reihe 3 und 4 nachvollziehen. Ebenso ist der deutliche „wannenförmiger“ Verlauf der Knorpelsteifigkeitswerte innerhalb der einzelnen Reihen erkennbar (Vgl. Abb. 26/27).

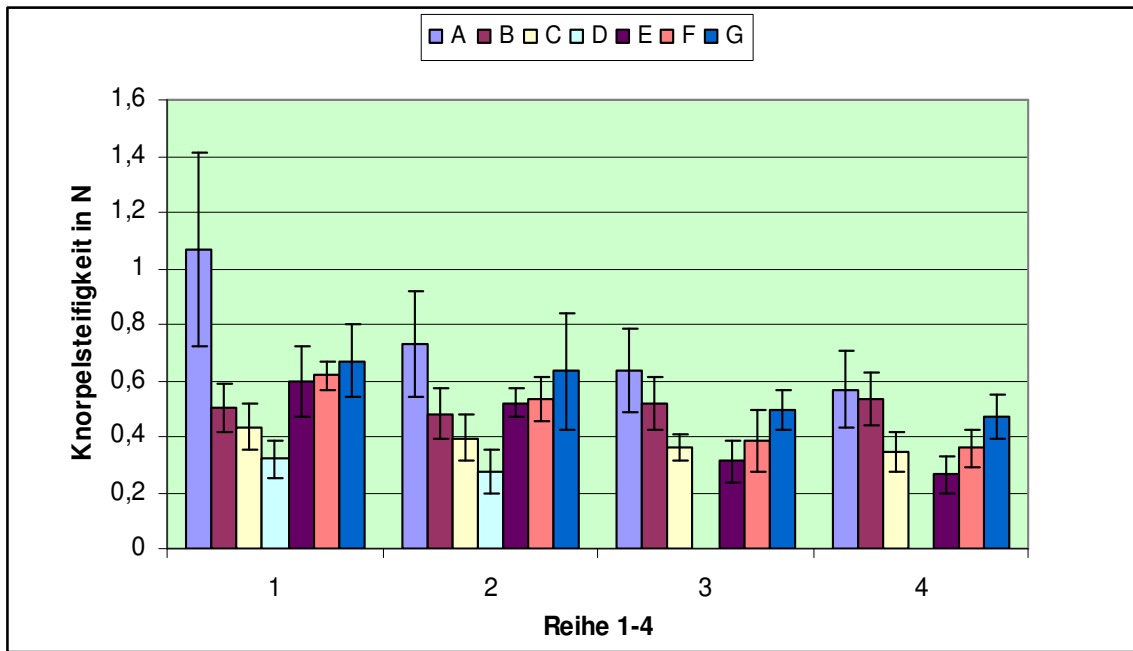


Abb. 28: Mittelwerte zur Knorpelsteifigkeit in Newton mit Standardabweichung am rechten Knie bei 15 Pferden; nach Reihen geordnet

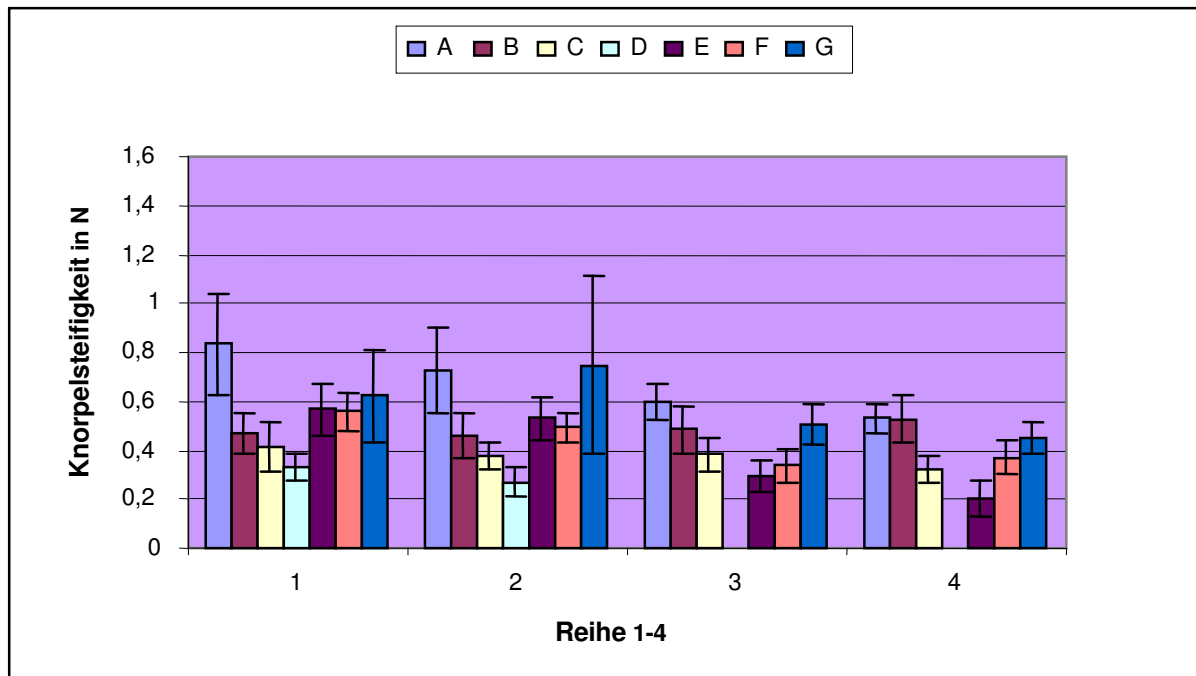


Abb. 29: Mittelwerte zur Knorpelsteifigkeit in Newton mit Standardabweichung am linken Knie bei 15 Pferden; nach Reihen geordnet

8.1.3 Ergebnisse zur Messmethodik

In den Abb. 30 a/b sind die Unterschiede zwischen der 1. und 2. bzw. 3. und 4. Messung graphisch dargestellt (Kap. 7.3). Die Differenzen zwischen den einzelnen Messungen wurden anhand einer zweifaktoriellen Varianzanalyse berechnet. Dabei konnte zwischen der 1. und 2. Messung eine Abnahme der Knorpelsteifigkeit um 2,73 % nachgewiesen werden, zwischen der 3. und 4. Messung fand eine Abnahme um 4,48 % statt. Diese Abnahmen waren mit $p < 0,05$ signifikant.

Beim Vergleich der Knorpelsteifigkeit zwischen dem ersten und zweiten Durchgang ergab sich eine nicht signifikante Reduzierung der Werte um 0,85 % (Abb. 31 a). In einer nachträglichen Untersuchung wurde die Veränderung zwischen Messung 1 und Messung 3 geprüft. Das Ergebnis war eine nicht signifikante Reduzierung der Knorpelsteifigkeit um 0,02 % (Abb. 31 b).

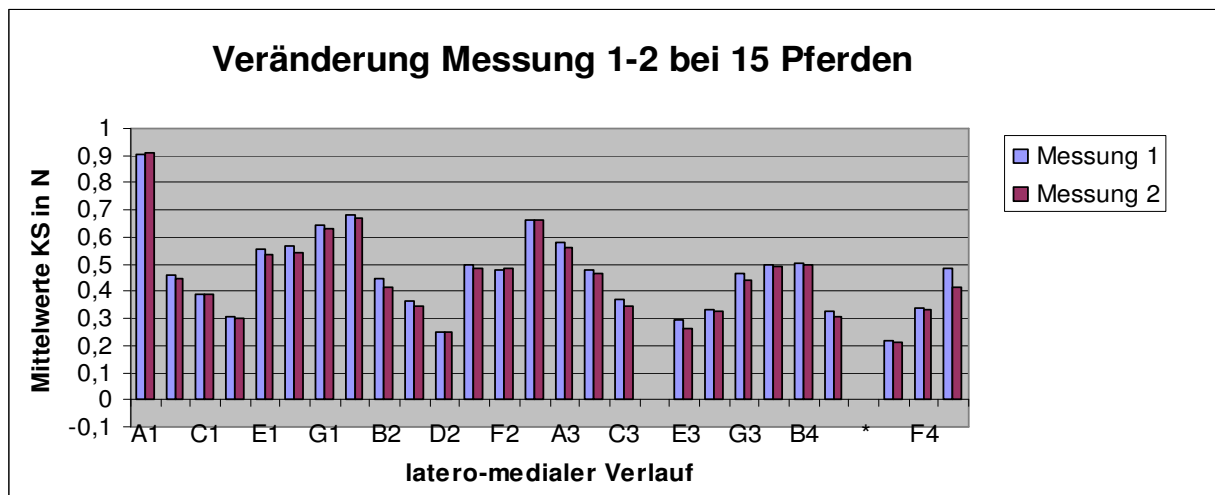


Abb. 30 a: Veränderung der Mittelwerte zur Knorpelsteifigkeit zwischen 1. und 2. Messung

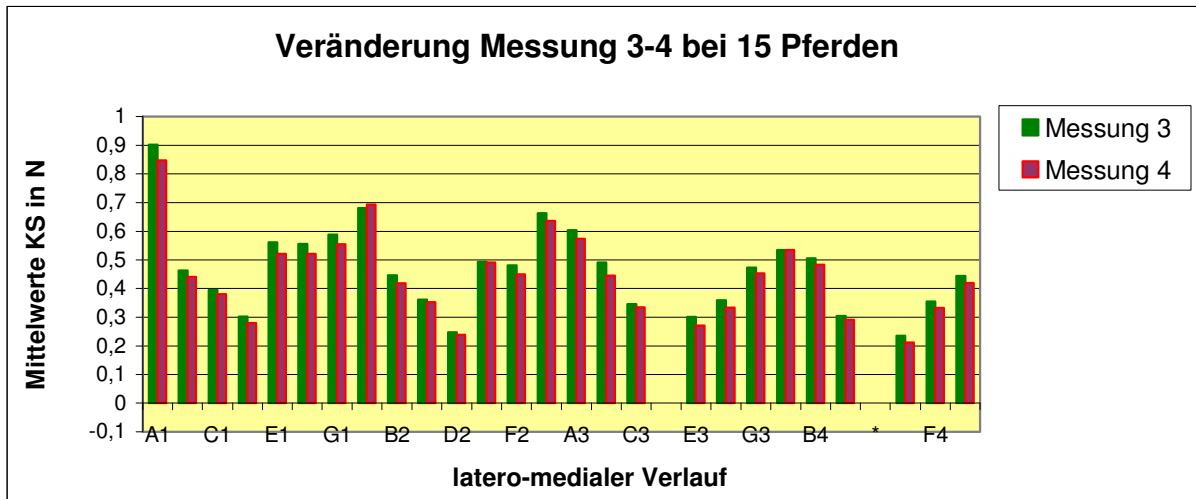


Abb. 30b: Veränderung der Mittelwerte zur Knorpelsteifigkeit zwischen 3. und 4. Messung

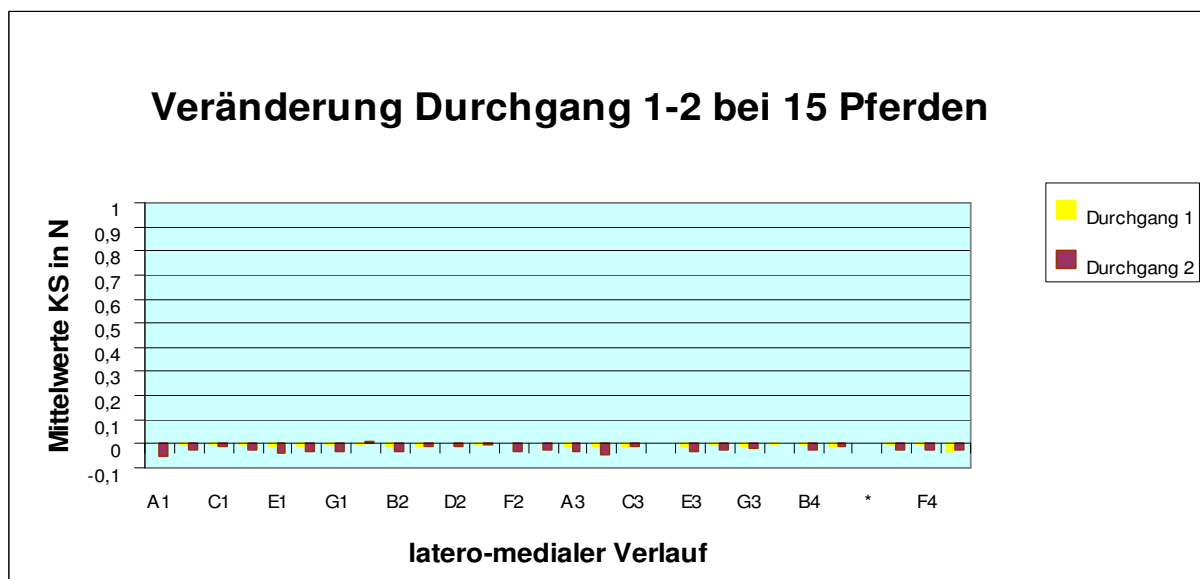


Abb. 31 a: Veränderung der Mittelwerte zur Knorpelsteifigkeit zwischen Durchgang 1 und 2

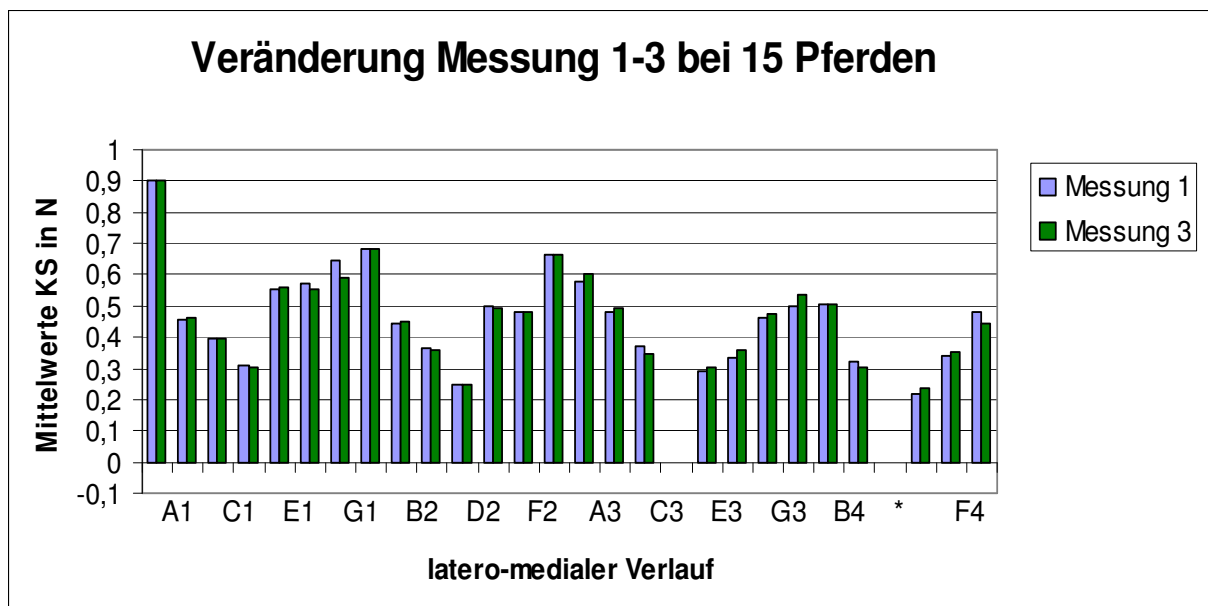


Abb. 31b: Veränderung der Mittelwerte zur Knorpelsteifigkeit zwischen der 1. und 3. Messung

8.2 Ergebnisse zur Knorpeldicke am distalen Femur

Die Messpunkte zur Knorpeldicke sind mit den 26 Messpunkten der Knorpelsteifigkeit identisch. Die Knorpeldicke am rechten Knie schwankt zwischen 0,704 mm am Punkt A1 (abaxial im proximalen Bereich des lateralen Rollkamms) und 2,838 mm am Punkt E3 (kranialer Bereich des medialen Femurkondylus) (Tab. 9). Die Knorpeldicke am linken Knie schwankt zwischen 0,682 mm am Punkt G1 (abaxial im proximalen Bereich des medialen Rollkammes) und 2,824 mm ebenfalls am Punkt E3 (kranialer Bereich des medialen Femurkondylus) (Tab. 10).

In den Abb. 32 und 33 sind die Mittelwerte zur Knorpeldicke jeweils am rechten und am linken Kniegelenk bei 15 Pferden nach Positionen geordnet graphisch dargestellt. Insgesamt nimmt die Knorpeldicke sowohl rechts als auch links von der Position A-D (vom lateralen Rollkamm zur Trochlea ossis femoris) zu und nach G hin (von der Trochlea ossis femoris zum medialen Rollkamm) wieder ab. Sie verhält sich daher umgekehrt zur Knorpelsteifigkeit. Auffallend ist im Bereich der Positionen E, F und G, dass bei den Reihen 3 und 4 (gesamter medialer Kondylus) deutliche Zunahmen der Knorpeldicke vorhanden sind.

Der Blick in die Daten zeigt, dass für die Gelenkfläche des rechten Femur außer an Position B (axial auf dem Scheitel des lateralen Rollkammes und des lateralen Kondylus) generell von

Reihe 1 nach Reihe 4 eine Zunahme der Knorpeldicke festzustellen ist (Abb. 32). Der Gelenkknorpel ist also an den Kondylen dicker als im Femoropatellargelenk. In Position B (axial auf dem Scheitel des lateralen Rollkammes und des lateralen Kondylus) jedoch verhalten sich die verschiedenen Reihen umgekehrt. Diese Ergebnisse stimmen mit dem linken Kniebereich nahezu überein. Die Messreihen in Position A und C sind auf beiden Seiten gleich (Abb. 32/33).

Messpunkte der Knorpeldicke 15 Pferde rechtes Knie			Mittelwerte in mm	Standardabweichung
Verlauf	Position	Reihe		
latero - medialer Verlauf	A	1	0,704	0,159
		2	0,731	0,196
		3	1,082	0,164
		4	0,998	0,148
	B	1	1,918	0,474
		2	1,664	0,286
		3	1,344	0,275
		4	1,193	0,289
	C	1	2,036	0,443
		2	2,038	0,292
		3	2,087	0,254
		4	2,373	0,360
	D	1	1,933	0,352
		2	2,107	0,438
		3	x	X
		4	x	X
	E	1	1,462	0,319
		2	1,464	0,329
		3	2,838	0,411
		4	2,664	0,320
	F	1	1,182	0,294
		2	1,338	0,285
		3	1,627	0,369
		4	2,053	0,320
	G	1	0,689	0,117
		2	0,780	0,386
		3	1,406	0,263
		4	1,322	0,409

Tab. 9: Übersicht der Mittelwerte zur Knorpeldicke im mm mit Standardabweichung am rechten Knie bei 15 Pferden (Minimal- und Maximalwerte sind hervorgehoben)

Messpunkte der Knorpeldicke 15 Pferde linkes Knie			Mittelwerte in mm	Standardabweichung
Verlauf	Position	Reihe		
latero - medialer Verlauf	A	1	0,838	0,206
		2	0,829	0,195
		3	1,020	0,141
		4	0,927	0,149
	B	1	2,098	0,494
		2	1,860	0,335
		3	1,209	0,193
		4	1,051	0,213
	C	1	2,273	0,333
		2	2,287	0,435
		3	1,929	0,274
		4	2,233	0,427
	D	1	1,600	0,336
		2	1,680	0,297
		3	X	X
		4	X	X
	E	1	1,340	0,203
		2	1,458	0,260
		3	2,824	0,370
		4	2,784	0,351
	F	1	1,016	0,184
		2	1,291	0,268
		3	2,367	0,581
		4	2,309	0,323
	G	1	0,682	0,145
		2	0,698	0,170
		3	1,460	0,470
		4	1,476	0,328

Tab. 10: Übersicht der Mittelwerte zur Knorpeldicke im mm mit Standardabweichung am linken Knie bei 15 Pferden (Minimal- und Maximalwerte sind hervorgehoben).

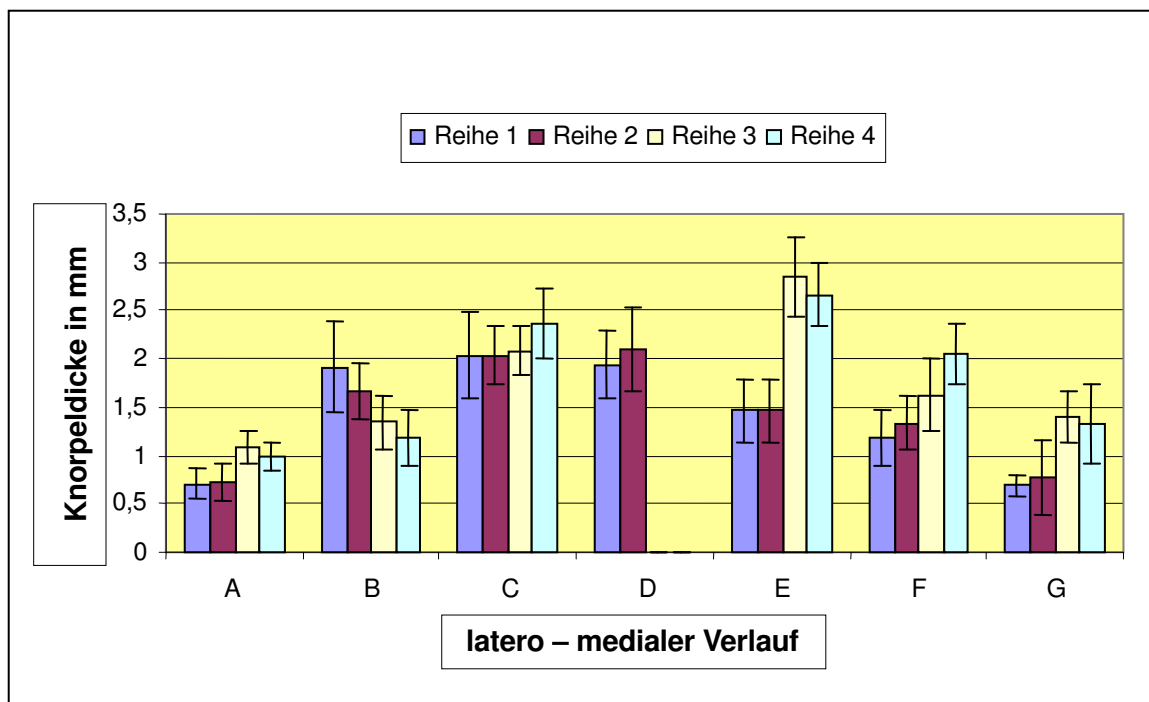


Abb. 32: Mittelwerte zur Knorpeldicke in mm mit Standardabweichung am rechten Knie bei 15 Pferden; nach Positionen geordnet

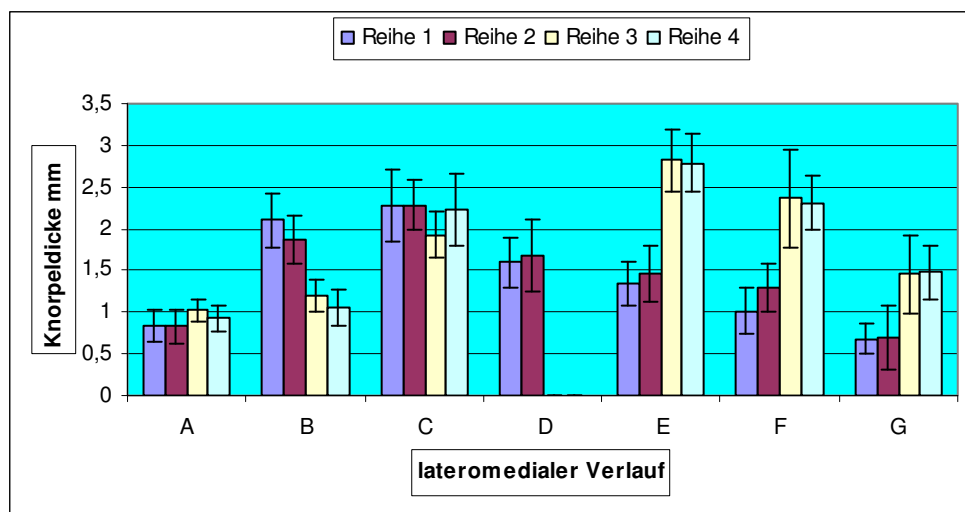


Abb. 33: Mittelwerte zur Knorpeldicke in mm mit Standardabweichung am linken Knie bei 15 Pferden; nach Positionen geordnet

8.2.1. Ergebnisse zum Seiten- Reihen- und Positionsvergleich der Knorpeldicke an den verschiedenen Messpunkten (Tab. 11)

Anhand einer dreifaktoriellen Varianzanalyse wurde die Beziehung zwischen der Knorpeldicke und den Messpunkten bezüglich der unabhängigen Merkmale Seite, Reihe und Position durchgeführt (Kap. 7.1).

Seitenvergleich:

Da der p-Wert für den Mittelwert aus 3 Knorpeldickenmessungen je Lokalisation $>0,05$, bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Seiten.

Reihen- und Positionsvergleich:

Bei der statistischen Auswertung der Mittelwerte zur Knorpeldicke bestehen bei einem p-Wert $<0,0001$ gemittelt über beide Seiten signifikante Unterschiede zwischen den Reihen und den Positionen. Werden dagegen die Positionen D1 und D2 (Trochlea ossis femoris) in den Reihen 1 und 2 berücksichtigt, können mit $p >0,05$ keine Reihenunterschiede nachgewiesen werden.

Wechselwirkungen:

Bei der Untersuchung der paarweisen Wechselwirkung zwischen Seite und Reihe mit $mKD = 0,85$ ergibt sich kein statistisch signifikantes Ergebnis. Es können also keine Reihenunterschiede zwischen den Seiten links und rechts nachgewiesen werden. Durch die Berücksichtigung der Position D verändert sich der p-Wert unwesentlich ($p = 0,82$).

Die Wechselwirkung zwischen Seite und Position führt mit $p = 0,106$ zu einem nicht signifikanten Ergebnis. Werden die Positionen D1 und D2 (Trochlea ossis femoris) in Reihe 1 und 2 berücksichtigt, entsteht für den Mittelwert mit $p <0,0001$ ein positionsabhängiger signifikanter Seitenunterschied.

Wie bei der Knorpelsteifigkeit sind die deutlichsten signifikanten paarweisen Wechselwirkungen mit $p <0,001$ die Knorpeldicke beim Vergleich zwischen Reihe und Position entstanden. Die Unterschiede zwischen den Reihen gemittelt über die rechte und linke Seite sind positionsabhängig.

		Haupteffekte			Wechselwirkungen		
<i>Messgröße</i>	<i>Messung</i>	<i>Seite</i>	<i>Reihe</i>	<i>Position</i>	<i>Seite-Reihe</i>	<i>Seite-Position</i>	<i>Reihe-Position</i>
<i>KD ohne D</i>	m=Ø	p= 0,067	p= 0,0001	p= 0,0001	p= 0,85	p= 0,106	p= 0,0001
<i>KD mit D</i>	m=Ø	p= 0,825	p= 0,59	p= 0,0001	p= 0,82	p= 0,0001	p= 0,0001

Tab. 11: p-Werte zur Knorpeldicke (KD) ohne/mit Position D mit den Haupteffekten Seite, Reihe, Position sowie den Wechselwirkungen Seite-Reihe, Seite-Position, Reihe-Position; die signifikanten p-Werte ($\leq 0,05$) sind hervorgehoben

8.2.2. Ergebnisse zum Vergleich der Knorpeldicke zwischen lateral und medial

Bei der Untersuchung der Knorpeldicke anhand einer vierfaktoriellen Varianzanalyse (Kap. 7.2) liegen in den Reihen 1-4 mit $p < 0,0001$ signifikante Unterschiede zwischen lateral und medial gemittelt über Seite, Reihe und sämtlichen Positionen vor (Abschnitt 7.2).

In den Abb. 34 und 35 sind die Werte zur Knorpeldicke am rechten und linken Knie von 15 Pferden nach den Reihen geordnet aufgeführt. In beiden Graphiken lassen sich Unterschiede zwischen lateral und medial nachvollziehen. Die Knorpeldicke ist im Femoropatellargelenk, also in Reihe 1 und 2 im Bereich der lateralen Gelenkhälfte sowohl rechts als auch links dicker als medial, im Femorotibialgelenk (Reihe 3-4) dagegen ist der Knorpel an beiden Seiten im medialen Areal dicker als lateral. Ebenso ist der umgekehrte „wannenförmige“ Verlauf der Knorpeldicke innerhalb der einzelnen Reihen erkennbar (Vgl. Abb. 32/33). Die Knorpeldicke verhält sich gegensätzlich zur Knorpelsteifigkeit. Mit zunehmender Knorpelsteifigkeit nehmen die Werte zur Knorpeldicke ab.

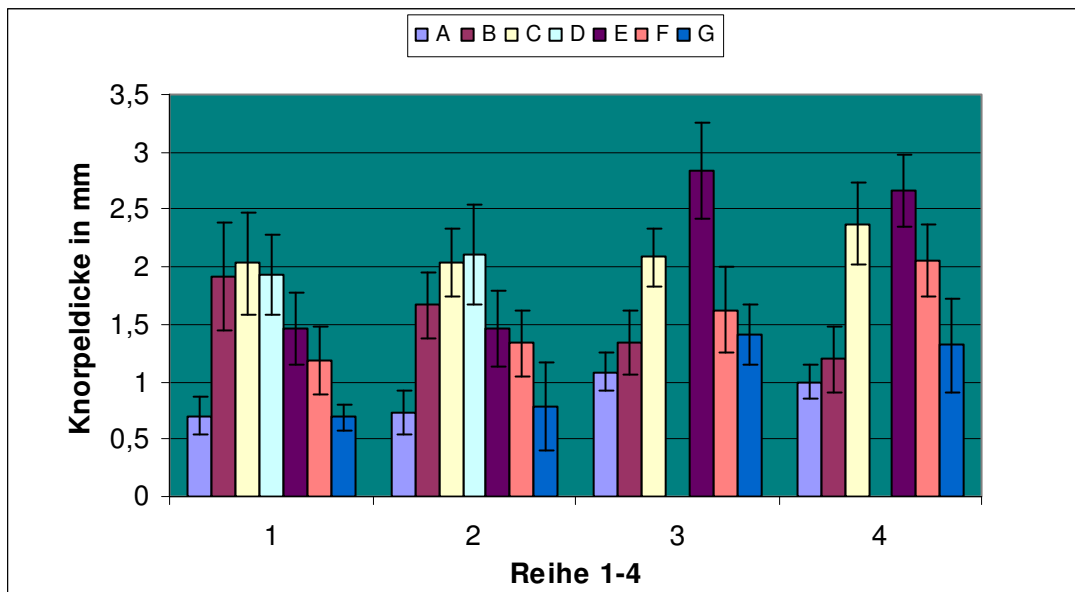


Abb. 34: Mittelwerte zur Knorpeldicke in mm mit Standardabweichung am rechten Knie bei 15 Pferden; nach Reihen geordnet

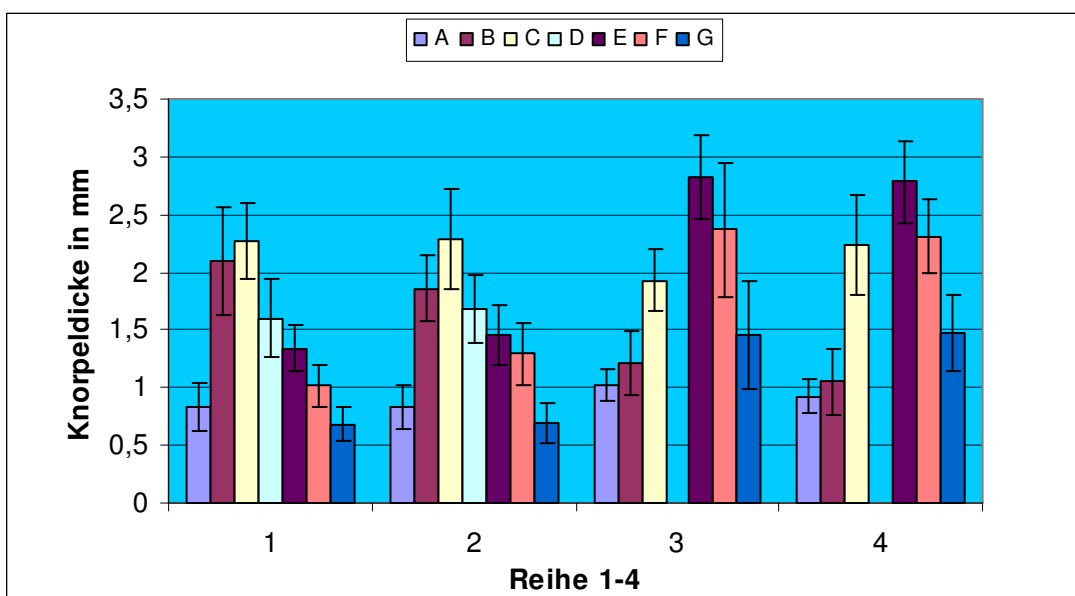


Abb. 35: Mittelwerte zur Knorpeldicke in mm mit Standardabweichung am linken Knie bei 15 Pferden; nach Reihen geordnet

8.3 Ergebnisse zum Glykosaminoglykangehalt

Der Glykosaminoglykangehalt am rechten Knie schwankt zwischen 23,128 µg/mg Knorpel am Punkt F2 (distaler Scheitelpunkt des medialen Rollkammes) und 37,484 µg/mg Knorpel am Punkt F4 (kaudaler Scheitelpunkt des medialen Femurkondylus) (Tab. 12).

Der Glykosaminoglykangehalt am linken Knie schwankt zwischen 21,638 µg/mg Knorpel am Punkt F2 (distaler Scheitelpunkt des medialen Rollkammes) und 37,896 µg/mg Knorpel am Punkt B3 (kranialer Bereich des lateralen Kondylus) (Tab. 13).

In den Abb. 36 und 37 sind die Mittelwerte zum Glykosaminoglykangehalt jeweils am rechten und am linken Kniegelenk bei 15 Pferden graphisch nach Positionen geordnet dargestellt.

Messpunkte Glykosaminoglykangehalt 15 Pferde rechtes Knie			Mittelwerte in µg/mg	Standardabweichung
Verlauf	Position	Reihe		
latero - medialer Verlauf	B	1	29,656	11,461
		2	24,094	7,069
		3	34,664	10,603
		4	30,495	12,350
	D	1	36,905	11,02
		2	25,619	7,426
		3	x	x
		4	x	x
	F	1	25,431	10,711
		2	23,128	7,780
		3	31,950	13,384
		4	37,484	10,487

Tab. 12: Übersicht der Mittelwerte zum Glykosaminoglykangehalt in µg/mg Knorpel mit Standardabweichung am rechten Knie bei 15 Pferden (Minimal- und Maximalwerte sind hervorgehoben).

Messpunkte Glykosaminoglykangehalt 15 Pferde linkes Knie			Mittelwerte in µg/mg	Standardabweichung
Verlauf	Position	Reihe		
latero - medialer Verlauf	B	1	27,094	12,653
		2	22,517	7,617
		3	37,896	7,417
		4	29,120	8,624
	D	1	35,011	7,424
		2	27,065	10,095
		3	x	x
		4	x	x
	F	1	22,674	8,413
		2	21,638	5,877
		3	33,860	7,824
		4	34,477	9,908

Tab. 13: Übersicht der Mittelwerte zum Glykosaminoglykangehalt in µg/mg Knorpel mit Standardabweichung am linken Knie bei 15 Pferden (Minimal- und Maximalwerte sind hervorgehoben).

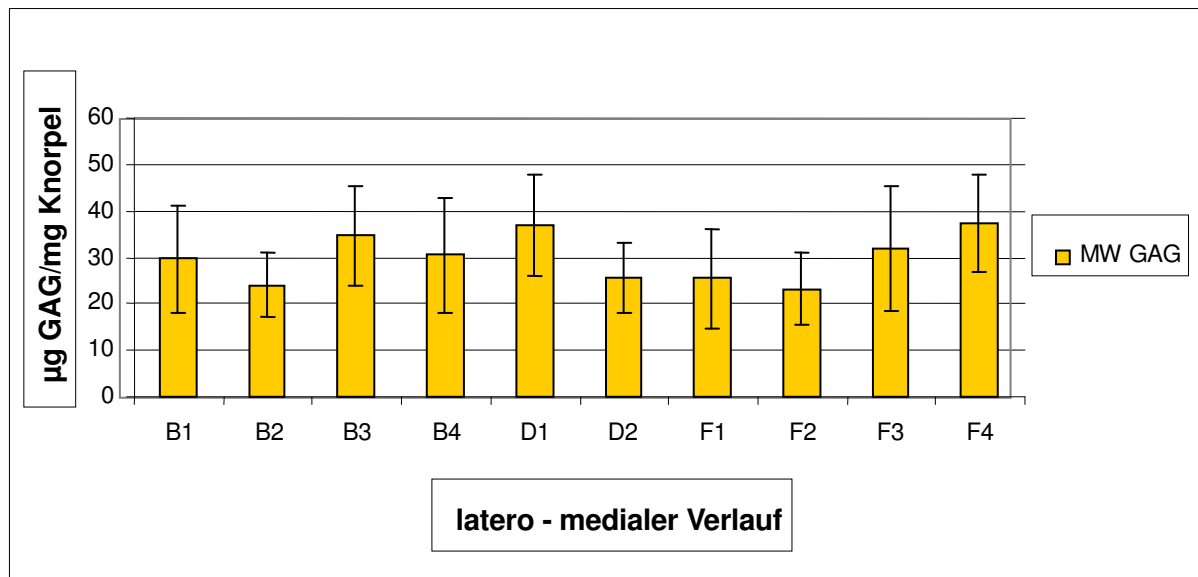


Abb. 36: Mittelwerte Glykosaminoglykangehalt in µg/mg Knorpel mit Standardabweichung am rechten Knie bei 15 Pferden; nach Positionen geordnet

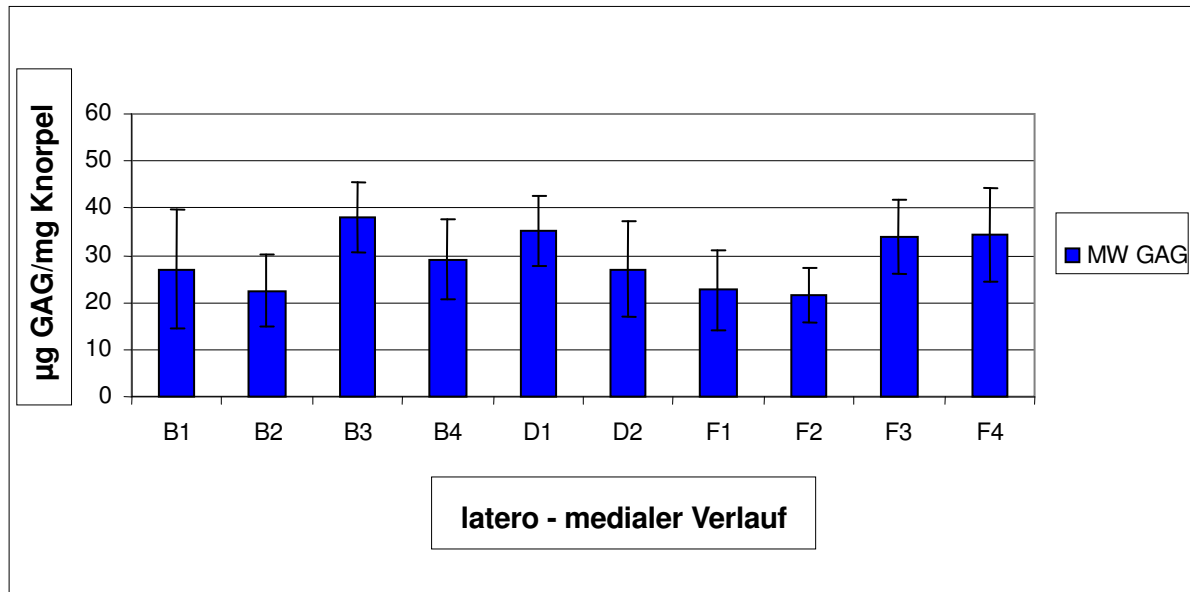


Abb. 37: Mittelwerte Glykosaminoglykangehalt in µg/mg Knorpel mit Standardabweichung am linken Knie bei 15 Pferden; nach Positionen geordnet

8.3.1. Ergebnisse zum Seiten- Reihen- und Positionsvergleich des Glykosaminoglykangehaltes an den verschiedenen Messpunkten (Tab. 14)

Anhand einer dreifaktoriellen Varianzanalyse wurde die Beziehung zwischen dem Glykosaminoglykangehalt und den Messpunkten bezüglich der unabhängigen Merkmale Seite, Reihe und Position durchgeführt (Kap. 7.1). In den Abb. 38/39 sind die Mittelwerte zum Proteoglykangehalt in µg/mg Knorpel mit Standardabweichung an rechten und linken Knie bei 15 Pferden nach den Reihen geordnet dargestellt.

Seitenvergleich:

Beim globalen Seitenvergleich der Mittelwerte zum Glykosaminoglykangehalt ergaben sich für $p > 0,05$ keine signifikanten Unterschiede zwischen den Seiten.

Reihenvergleich:

Demgegenüber bestehen bei einem p -Wert $< 0,001$ gemittelt über beide Seiten signifikante Unterschiede zwischen den Reihen. Die Unterschiede werden auch anhand der Abb. 38/39 deutlich. Der Glykosaminoglykangehalt in der gesamten Reihe 2 ist sowohl beim rechten als auch beim linken Knie niedrig. Deutlich höhere Werte sind im Femorotibialgelenk, also in den Reihen 3 und 4 erkennbar.

Positionsvergleich:

Ohne die Positionen D1 und D2 (Trochlea ossis femoris) kann mit $p = 0,615$ kein Unterschied zwischen den Positionen festgestellt werden. Werden dagegen die Positionen D1 und D2 in den Reihen 1 und 2 berücksichtigt, ist $p = 0,002$. Es ergeben sich also signifikante Unterschiede innerhalb der einzelnen Positionen. Die Abb. 38/39 zeigen, dass sowohl im rechten, als auch im linken Kniegelenk bei 15 Pferden die Position D1 aufgrund ihres hohen Glykosaminoglykangehaltes wahrscheinlich für die positionsabhängigen Unterschiede verantwortlich ist.

Wechselwirkungen:

Bei der Untersuchung der paarweisen Wechselwirkungen zwischen Seite und Reihe mit $p = 0,218$ ergeben sich für den Glykosaminoglykangehalt keine statistisch signifikante Wechselwirkungen. Es können also keine Reihenunterschiede zwischen den Seiten links und rechts nachgewiesen werden. Die Position D verändert den p-Wert unwesentlich (p-Wert = 0,291).

Die Wechselwirkung zwischen Seite und Position führt mit $p = 0,713$ zu einem nicht signifikanten Ergebnis. Die Unterschiede in den Positionen sind also nicht seitenabhängig, auch nicht durch Berücksichtigung der Messpunkte D1 und D2 ($p = 0,67$).

Eine deutliche signifikante paarweise Wechselwirkung mit $p < 0,05$ ist beim Vergleich zwischen Reihe und Position entstanden. Die Unterschiede zwischen den Reihen gemittelt über die linke und rechte Seite sind positionsabhängig.

		Haupteffekte			Wechselwirkungen		
Messgröße	Messung	Seite	Reihe	Position	Seite-Reihe	Seite-Position	Reihe-Position
GAG ohne D	1	p= 0,401	p= 0,0001	p= 0,615	p= 0,218	p= 0,713	p= 0,03
GAG mit D	1	p= 0,256	p= 0,001	p= 0,002	p= 0,291	p= 0,67	p= 0,02

Tab. 14: p-Werte zum Glykosaminoglykangehalt (GAG) ohne/mit Position D mit den Haupteffekten Seite, Reihe, Position sowie den Wechselwirkungen Seite-Reihe, Seite-Position, Reihe-Position; die signifikanten p-Werte ($\leq 0,05$) sind hervorgehoben

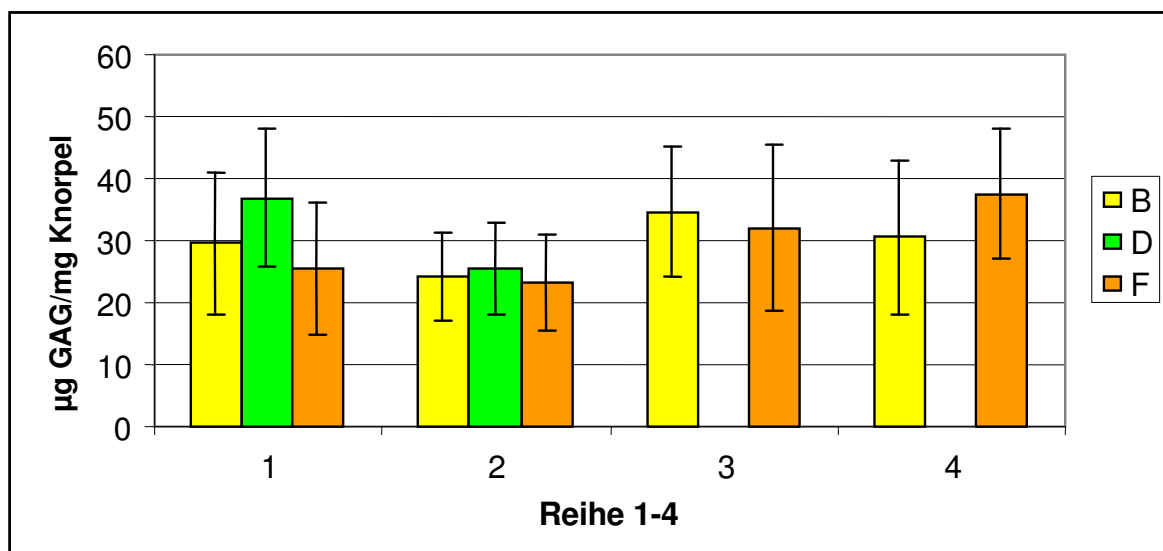


Abb. 38: Mittelwerte Glykosaminoglykangehalt in µg/mg Knorpel mit Standardabweichung am rechten Knie bei 15 Pferden; nach Reihen geordnet

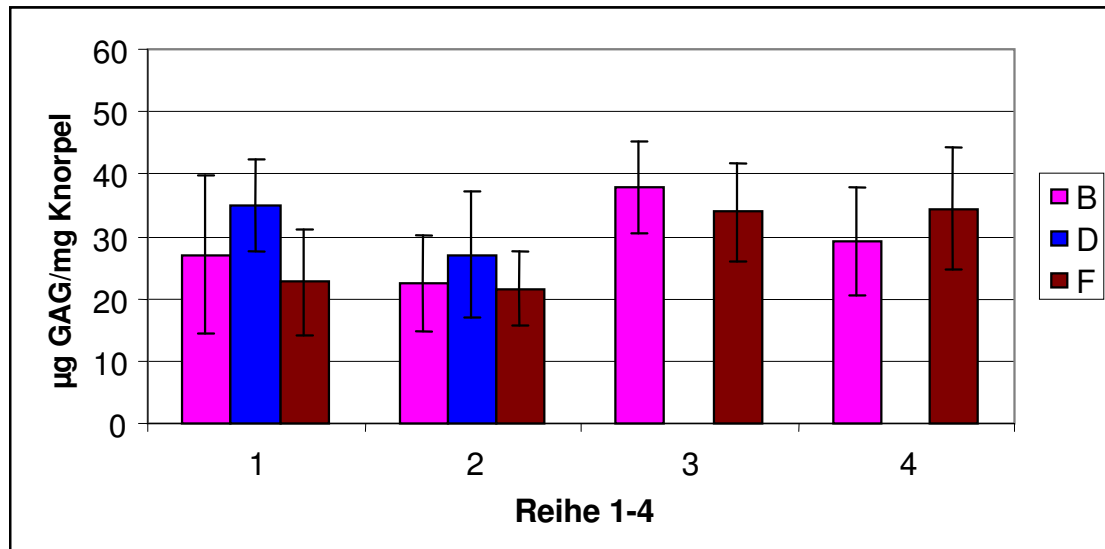


Abb. 39: Mittelwerte Glykosaminoglykangehalt in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Knorpel mit Standardabweichung am linken Knie bei 15 Pferden; nach Reihen geordnet

8.4 Ergebnisse zum Kollagengehalt

Der Hydroxyprolinegehalt am rechten Knie schwankt zwischen $8,449 \mu\text{g}/\text{mg}$ Knorpel am Punkt F4 (kaudaler Scheitelpunkt des medialen Kondylus) und $13,862 \mu\text{g}/\text{mg}$ Knorpel am Punkt B2 (distaler Scheitelpunkt des lateralen Rollkammes) (Tab. 15). Der daraus errechnete Kollagengehalt des Gelenkknorpels liegt zwischen $62,52 \mu\text{g}/\text{mg}$ und $102,579 \mu\text{g}/\text{mg}$ Knorpel.

Der Hydroxyprolinegehalt am linken Knie variiert zwischen $8,987 \mu\text{g}/\text{mg}$ Knorpel am Punkt D1 (Trochlea ossis femoris) und $14,423 \mu\text{g}/\text{mg}$ Knorpel am Punkt F2 (distaler Scheitelpunkt des medialen Rollkammes) (Tab. 16). Der berechnete Kollagengehalt schwankt zwischen $66,502 \mu\text{g}/\text{mg}$ und $106,73 \mu\text{g}/\text{mg}$ Knorpel.

In den Abb. 40 und 41 sind die Mittelwerte zum Hydroxyprolinegehalt jeweils am rechten und am linken Kniegelenk bei 15 Pferden nach den Positionen geordnet graphisch dargestellt.

Messpunkte Hydroxyprolinegehalt 15 Pferde rechtes Knie			Mittelwerte in µg/mg	Standardabweichung	Kollagengehalt µg/mg Knorpel
Verlauf	Position	Reihe			
latero - medialer Verlauf	B	1	11,866	4,166	87,808
		2	13,862	5,458	102,579
		3	10,193	4,194	75,428
		4	11,701	4,522	86,587
	D	1	9,022	3,214	66,761
		2	9,953	3,296	73,649
		3	x	x	x
		4	x	x	x
	F	1	12,036	4,956	89,066
		2	13,341	3,437	98,723
		3	10,340	8,240	76,516
		4	8,449	2,334	62,520

Tab. 15: Übersicht der Mittelwerte zum Hydroxyprolinegehalt in µg/mg Knorpel mit Standardabweichung und errechnetem Kollagengehalt am rechten Knie bei 15 Pferden (Minimal- und Maximalwerte sind hervorgehoben).

Messpunkte Hydroxyprolinegehalt 15 Pferde linkes Knie			Mittelwerte in µg/mg	Standardabweichung	Kollagengehalt in µg/mg Knorpel
Verlauf	Position	Reihe			
latero-medialer Verlauf	B	1	12,471	4,857	92,285
		2	13,858	4,035	102,549
		3	10,897	4,832	80,638
		4	9,977	3,476	73,829
	D	1	8,987	4,244	66,502
		2	9,396	3,703	69,530
		3	x	x	x
		4	x	x	x
	F	1	13,372	4,027	98,953
		2	14,423	6,463	106,730
		3	9,517	3,366	70,428
		4	10,742	4,344	79,491

Tab. 16: Übersicht der Mittelwerte zum Hydroxyprolinegehalt in µg/mg Knorpel mit Standardabweichung und errechnetem Kollagengehalt am linken Knie bei 15 Pferden (Minimal- und Maximalwerte sind hervorgehoben).

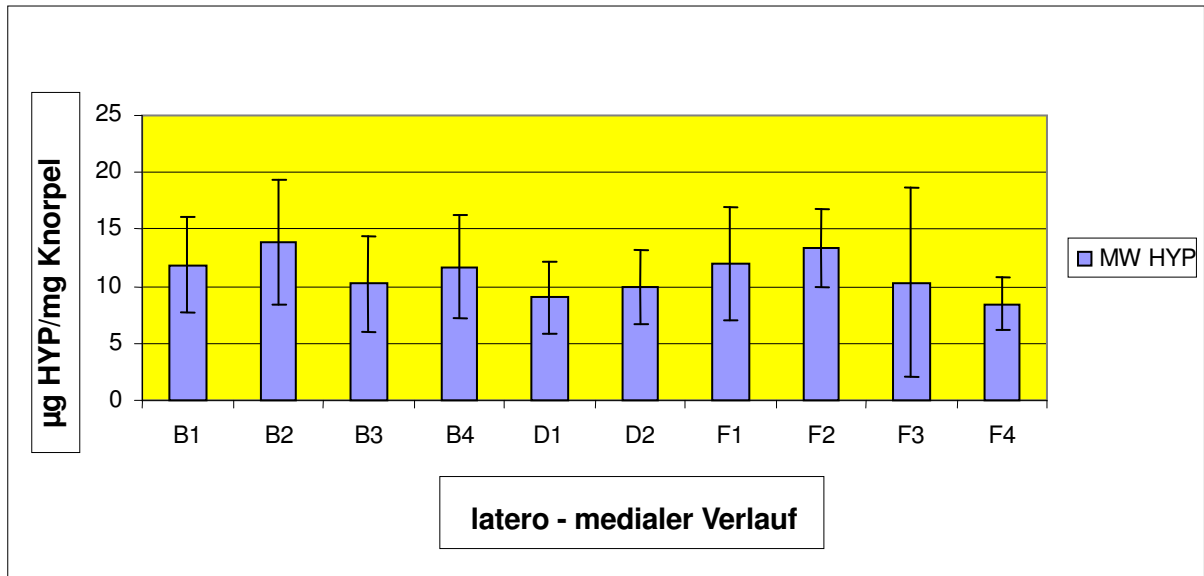


Abb. 40: Mittelwerte Hydroxyprolingehalt in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Knorpel mit Standardabweichung am rechten Knie bei 15 Pferden

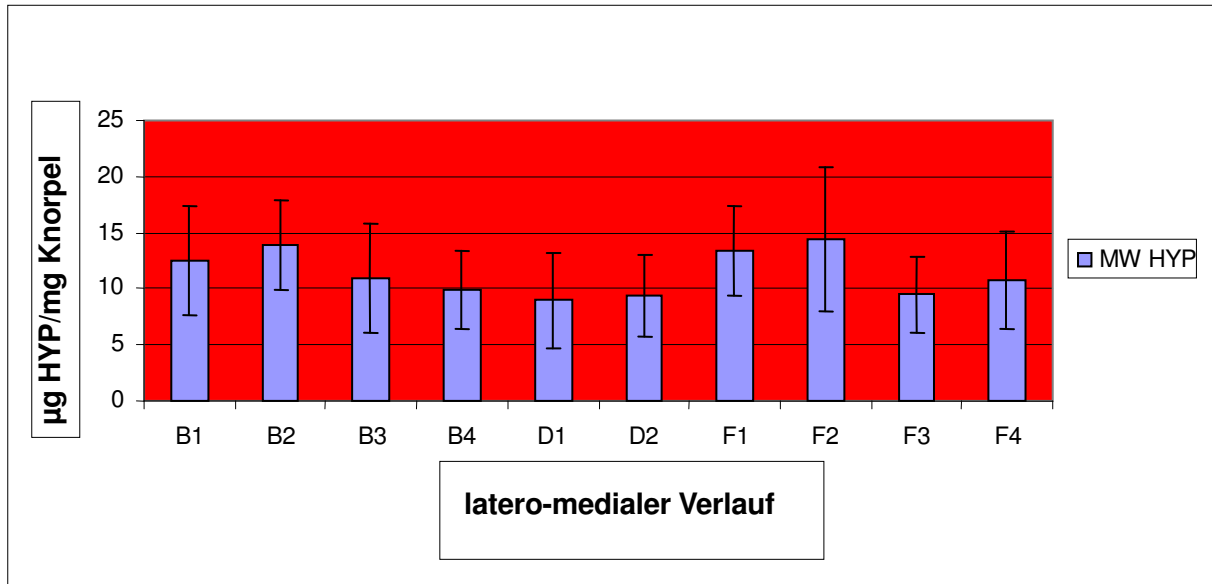


Abb. 41: Mittelwerte Hydroxyprolingehalt in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Knorpel mit Standardabweichung am linken Knie bei 15 Pferd

8.4.1. Ergebnisse zum Seiten- Reihen- und Positionsvergleich des Kollagengehaltes an den verschiedenen Messpunkten (Tab. 17)

Anhand einer dreifaktoriellen Varianzanalyse wurde die Beziehung zwischen dem Hydroxyprolinegehalt und den Messpunkten bezüglich der Merkmale Seite, Reihe und Position durchgeführt (Kap. 7.1). In den Abb. 42 und 43 sind die Messergebnisse zum Hydroxyprolinegehalt innerhalb der Reihen jeweils am rechten und linken Knie graphisch dargestellt. Auch durch diese Anordnung unterscheiden sich die Hydroxyprolinegehalte graphisch nur sehr geringgradig voneinander.

Seitenvergleich:

Beim globalen Seitenvergleich der Mittelwerte zum Hydroxyprolinegehalt ergibt sich für den p-Wert 0,61 ein nicht signifikanter Wert. Auch unter Berücksichtigung der Position D bestehen keine signifikanten Seitenunterschiede ($p=0,681$).

Reihenvergleich:

Es bestehen für die Reihen 1-4 bei einem p-Wert $<0,0001$ gemittelt über beide Seiten signifikante Unterschiede zwischen den Reihen. Für die Reihen 1-2 mit den Positionen D1 und D2 ist der p-Wert $>0,05$ und damit nicht signifikant. Bei Berücksichtigung der Positionen D1 und D2 werden also keine Unterschiede zwischen den Reihen festgestellt.

Positionsvergleich:

Ohne die Positionen D1 und D2 (Trochlea ossis femoris) kann mit $p=0,459$ kein Unterschied zwischen den Positionen gemittelt über beide Seiten und Reihen festgestellt werden. Werden dagegen die Positionen D1 und D2 in den Reihen 1 und 2 berücksichtigt, ist der p-Wert $<0,0001$ und damit signifikant. Durch den niedrigen Hydroxyprolinegehalt an den Messpunkten D1 und D2 werden die Unterschiede zwischen den einzelnen Positionen wahrscheinlich signifikant (s. Abb. 40/41).

Wechselwirkungen:

Bei der Untersuchung der paarweisen Wechselwirkungen zwischen Seite und Reihe mit $p = 0,925$ ergeben sich für den Hydroxyprolinegehalt keine statistisch signifikanten Wechselwirkungen. Es können also keine Reihenunterschiede zwischen den Seiten links und

rechts nachgewiesen werden. Dies gilt ebenso, wenn die Messpunkte D1 und D2 berücksichtigt werden ($p = 0,638$).

Die Wechselwirkung zwischen Seite und Position führt mit $p = 0,383$ zu einem nicht signifikanten Ergebnis. Es werden demnach im Seitenvergleich keine Unterschiede zwischen den Positionen nachgewiesen. Die Berücksichtigung der Messpunkte D1 und D2 führt ebenfalls zu einem nicht signifikanten Ergebnis ($p = 0,51$).

Die Wechselwirkung zwischen Reihe und Position ist mit $p > 0,05$ nicht signifikant. Es können daher keine signifikanten Positionsunterschiede innerhalb der Reihen 1-4 unterschieden werden. Auch nicht, wenn die Messpunkte D1 und D2 in der statistischen Auswertung verwendet werden.

		Haupteffekte			Wechselwirkungen		
<i>Messgröße</i>	<i>Messung</i>	<i>Seite</i>	<i>Reihe</i>	<i>Position</i>	<i>Seite-Reihe</i>	<i>Seite-Position</i>	<i>Reihe-Position</i>
<i>Hyp ohne D</i>	1	$p = 0,61$	$p = 0,0001$	$p = 0,459$	$p = 0,925$	$p = 0,383$	$p = 0,647$
<i>Hyp mit D</i>	1	$p = 0,681$	$p = 0,072$	$p = 0,0001$	$p = 0,638$	$p = 0,51$	$p = 0,683$

Tab. 17: p-Werte zum Hydroxyprolinegehalt (Hyp) ohne/mit Position D mit den Haupteffekten Seite, Reihe, Position sowie den Wechselwirkungen Seite-Reihe, Seite-Position, Reihe-Position; die signifikanten p-Werte ($\leq 0,05$) sind hervorgehoben

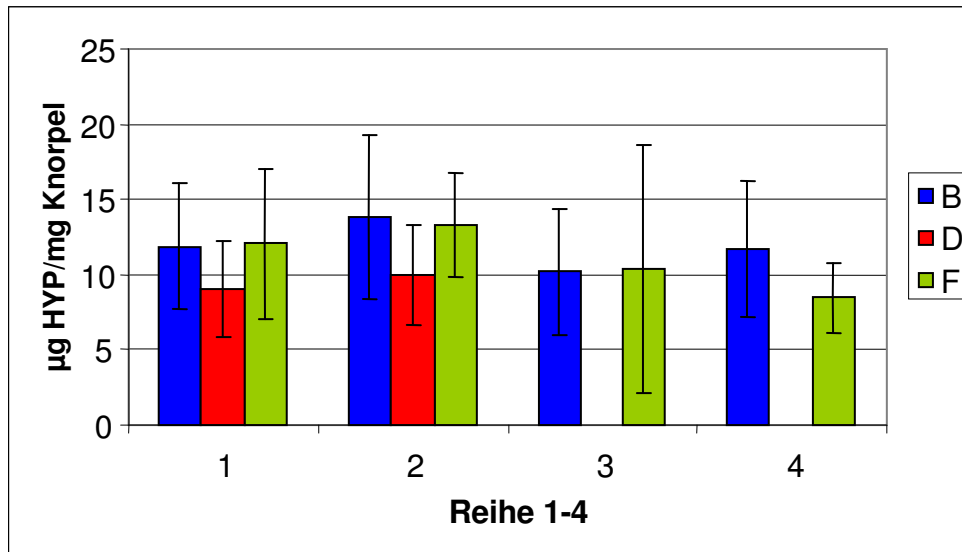


Abb. 42: Mittelwerte Hydroxyprolinegehalt in µg/mg Knorpel mit Standardabweichung am rechten Knie bei 15 Pferden; nach Reihen geordnet

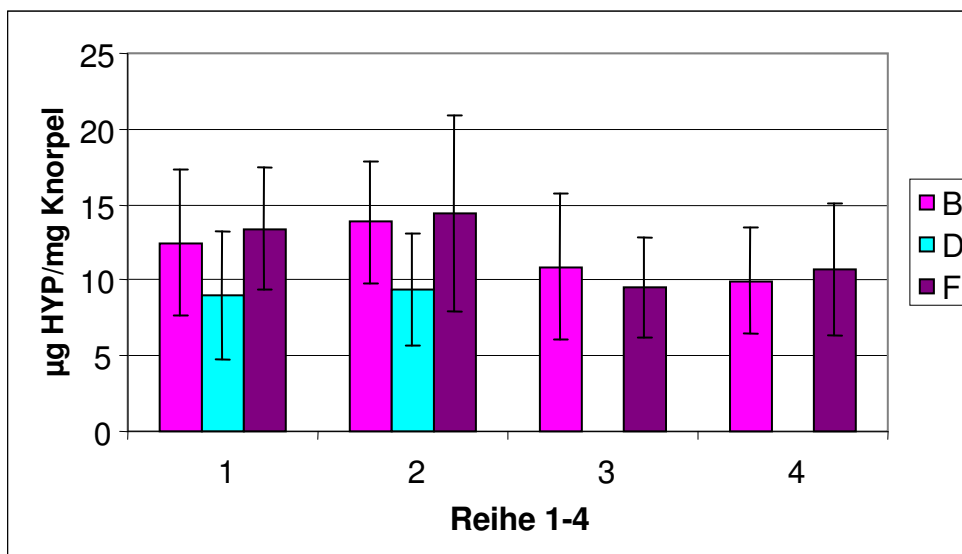


Abb. 43: Mittelwerte Hydroxyprolinegehalt in µg/mg Knorpel mit Standardabweichung am linken Knie bei 15 Pferden; nach Reihen geordnet

8.5 Ergebnisse zur Korrelation zwischen der Knorpelsteifigkeit und der Knorpeldicke

In Abb. 44 wird anhand eines Diagramms die Korrelation zwischen der mittleren Knorpeldicke und der mittleren Knorpelsteifigkeit bei 15 Pferden an der Position B1 graphisch dargestellt (Abschnitt 7.4).

Für die Position B1 (proximaler Scheitelpunkt des lateralen Rollkammes) besteht bei einem p-Wert $<0,001$ ein signifikanter Zusammenhang. Die Messpunkte in Abb. 44 zeigen bei zunehmender Knorpeldicke eine deutliche Tendenz zur Abnahme der Knorpelsteifigkeit. Der Regressionskoeffizient R ist für diese Position $-0,673$.

Weitere statistisch signifikante Zusammenhänge liegen an der Position C1 (abaxial im proximalen Bereich des lateralen Rollkammes) vor bei $p = 0,015$ und einem Regressionskoeffizienten $R = -0,444$ sowie an der Position D1 (Trochlea ossis femoris) ($p = 0,002$, $R = -0,538$).

Für die Reihe 2 entstehen signifikante Korrelationen an der Position D (Trochlea ossis femoris) ($p = 0,004$, $R = -0,516$) und für die Position G (abaxial im distalen Bereich des medialen Rollkammes) ($p = 0,034$, $R = -0,388$).

In Reihe 3 konnte ein signifikanter Zusammenhang an der Position F (kranialer Bereich des medialen Kondylus) mit $p = 0,014$ bei einem Korrelationskoeffizienten $R = -0,444$ nachgewiesen werden.

Reihe 4 besitzt an der Position G (abaxial im kaudalen Bereich des medialen Kondylus) eine signifikante Korrelation ($p < 0,009$, $R = -0,467$).

Für alle anderen Positionen am Kniegelenk konnten zwischen der Knorpelsteifigkeit und der Knorpeldicke keine signifikanten Zusammenhänge nachgewiesen werden.

Um den quantitativen Einfluss der Knorpeldicke auf die Knorpelsteifigkeitswerte zu untersuchen, lässt sich anhand des gepoolten Regressionskoeffizienten generell für alle Messpunkte berechnen, dass die mittlere Knorpelsteifigkeit in den Reihen 1-4 ohne die Position D pro Millimeter mittlerer Knorpeldickenzunahme um $0,073$ N signifikant abnimmt. Werden die Positionen D1 und D2 (Trochlea ossis femoris) in den Reihen 1 und 2 berücksichtigt, entsteht eine signifikante Abnahme der Knorpelsteifigkeit um $0,098$ N pro zunehmender Knorpeldicke in Millimeter.

Pseudoreplikation:

Bei der Pseudoreplikation werden alle Messungen pro Variablenpaar in einem Plot berücksichtigt (52 Messwerte pro Pferd). Es entsteht für den Zusammenhang zwischen Knorpeldicke und Knorpelsteifigkeit ein nicht linearer Verlauf (Abb. 45).

Die Korrelation ist für das Variablenpaar Knorpeldicke/Knorpelsteifigkeit mit $p < 0,001$ signifikant ($R = -0,652$).

In Bereichen mit geringer Knorpeldicke ($< 1,0$ mm) entstehen überproportional große Werte zur Knorpelsteifigkeit.

Zwischen den Werten 1,0 – 2,6 mm ist der Zusammenhang zwischen Knorpeldicke und Knorpelsteifigkeit linear. Mit zunehmender Knorpeldicke nehmen die Messwerte zur Knorpelsteifigkeit ab.

Ab hohen Knorpeldickenwerten ($> 2,6$ mm) erscheint es, als ob sich die Knorpelsteifigkeitswerte einem konstanten Wert (0,3 N) annähern würden.

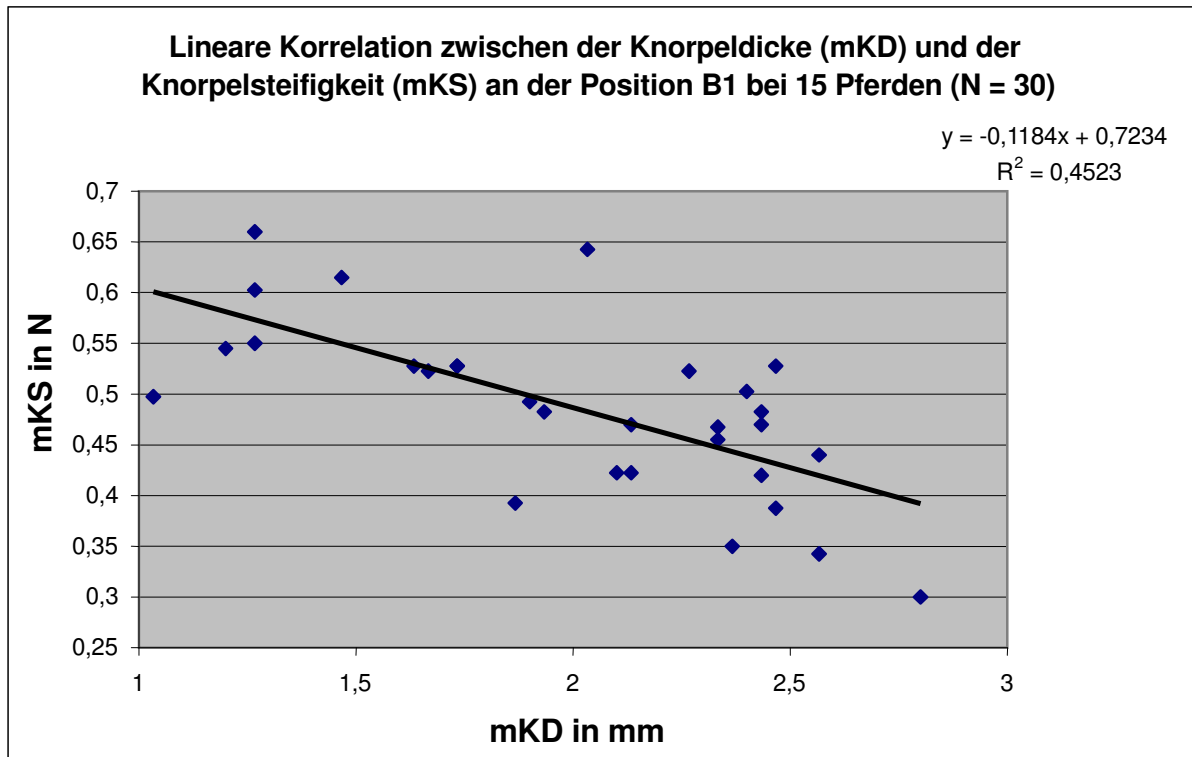


Abb. 44: Lineare Korrelation zwischen der Knorpeldicke in mm und der Knorpelsteifigkeit in N an der Position B1 (axialer Scheitelpunkt im proximalen Bereich des lateralen Rollkammes) bei 30 Kniegelenken

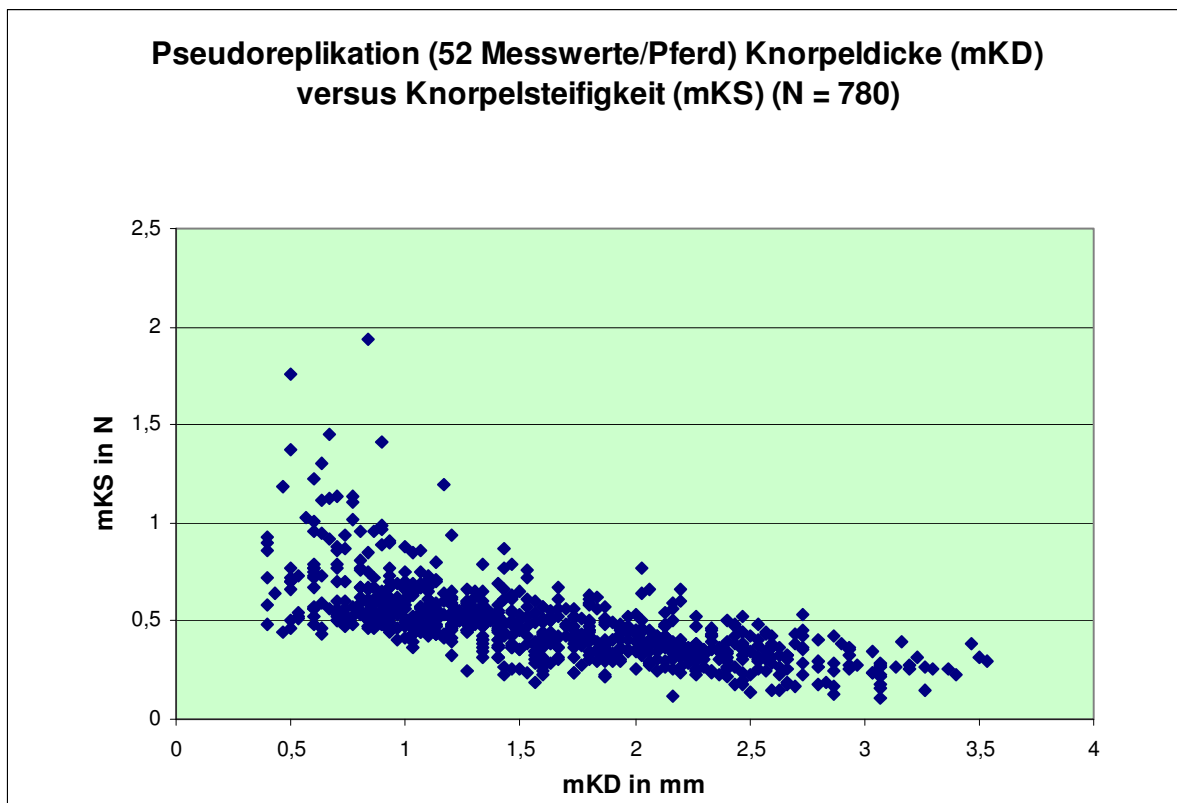


Abb. 45: Darstellung der Beziehung zwischen der Knorpeldicke in mm und der Knorpelsteifigkeit in N (52 Messwerte/Pferd; Pseudoreplikation)

8.5.1 Ergebnisse zur Korrelation zwischen der Knorpelsteifigkeit und dem Kollagengehalt

Abb. 46 zeigt den Zusammenhang zwischen dem Kollagengehalt und der Knorpelsteifigkeit. Für beide Parameter ergibt sich eine lineare Korrelation mit positivem Korrelationskoeffizienten ($R = 0,185$). Es wurde davon ausgegangen, dass es sich bei den ausgeklammerten Werten in Abb. 46 um Ausreißerwerte handelt. Diese wurden bei der Berechnung nicht berücksichtigt.

Mit zunehmendem Kollagengehalt, der entsprechend der gemessenen Hydroxyprolinwerte in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Knorpel berechnet wurde, steigen die Knorpelsteifigkeitswerte an. Die Abhängigkeit ist mit $p < 0,013$ signifikant.

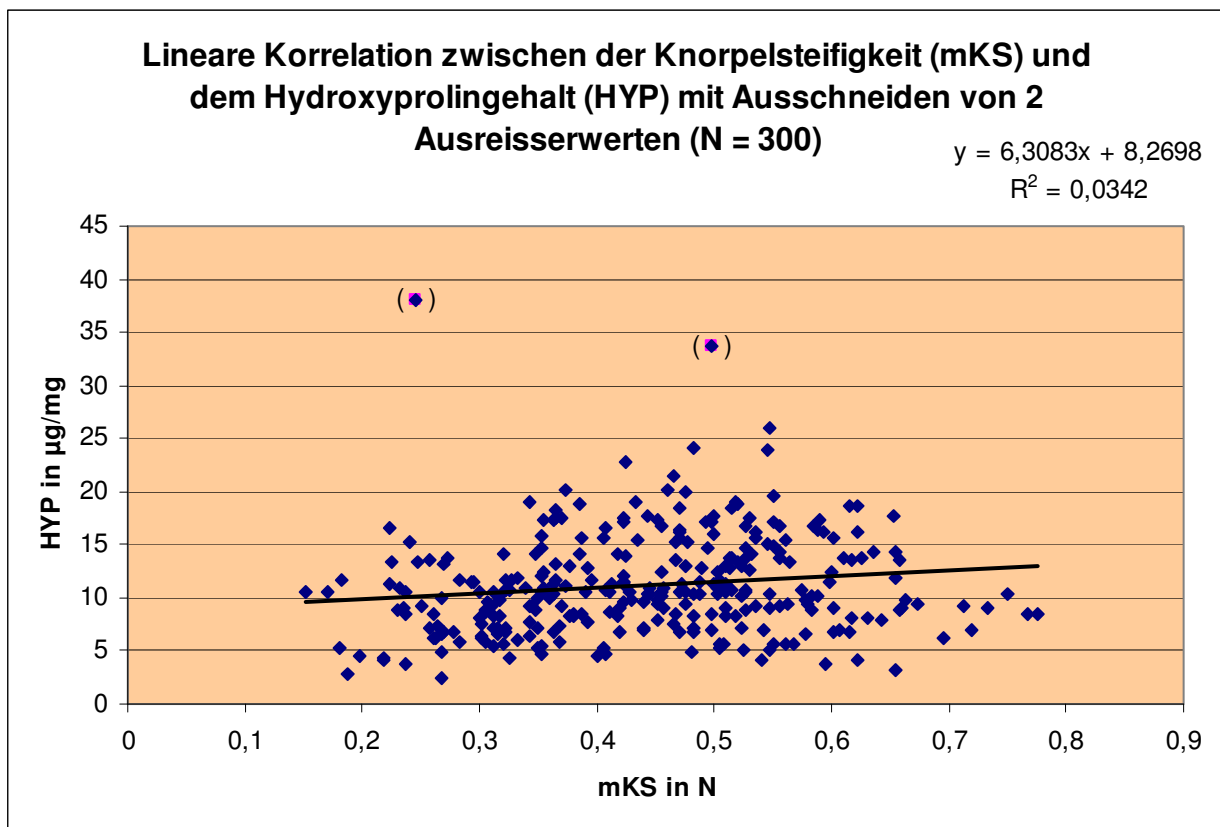


Abb. 46: lineare Korrelation zwischen der Knorpelsteifigkeit in N und dem Hydroxyprolinegehalt in µg/mg Knorpel mit Ausschneiden von 2 Ausreisserwerten (in Klammern)

8.5.2 Ergebnisse zur Korrelation zwischen der Knorpeldicke und dem Kollagengehalt

Bei den Untersuchungen zum Hydroxyprolinegehalt wurde anhand des gepoolten Regressionskoeffizienten für die Reihen 1-4 ohne die Position D (Trochlea ossis femoris) festgestellt, dass pro mm Knorpeldickenzunahme eine Abnahme des Hydroxyprolinegehaltes um 0,816 µg/mg Knorpel erfolgt. Für die Reihen 1-2 mit den Positionen D1 und D2 (Trochlea ossis femoris) entsteht eine Abnahme um 0,607 µg/mg Knorpel pro mm Knorpeldicke. Diese Abhängigkeit ist in Abb. 47 graphisch dargestellt.

Es besteht mit $p = 0,01$ und $R = -0,151$ eine signifikante Korrelation zwischen der Knorpeldicke und dem Hydroxyprolingehalt. Mit zunehmender Knorpeldicke kommt es zu einer geringen Abnahme des Hydroxyprolin- bzw. Kollagengehaltes. Die beiden Ausreißerwerte, die wie in Abb. 47 ausgeklammert dargestellt sind, wurden für die Untersuchung nicht berücksichtigt.

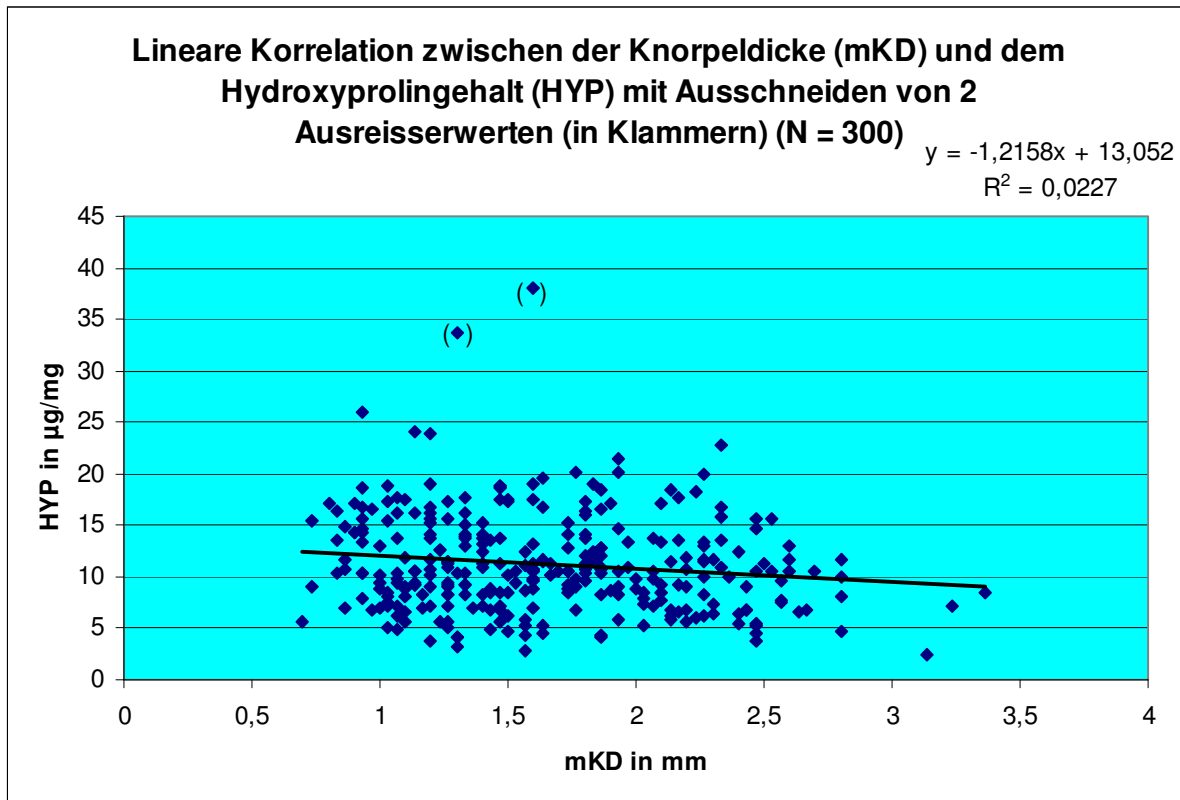


Abb. 47: lineare Korrelation zwischen der Knorpeldicke in mm und dem Hydroxyprolingehalt in µg/mg mit Ausschneiden von 2 Ausreisserwerten (in Klammern)

8.5.3 Ergebnisse zur Korrelation zwischen der Knorpelsteifigkeit bzw. Knorpeldicke und dem Glykosaminoglykangehalt

In den vorliegenden Untersuchungen konnten am gesunden Gelenkknorpel keine signifikanten Abhängigkeiten zwischen dem Glykosaminoglykangehalt und der Knorpeldicke ($p = 0,642$) sowie zwischen dem Glykosaminoglykangehalt und der Knorpelsteifigkeit ($p = 0,148$) nachgewiesen werden.

8.5.4 Ergebnisse zum Einfluss der Körpermasse

In Abb. 48 wird der Einfluss der Körpermasse auf die Knorpeldicke gemittelt über beide Seiten graphisch dargestellt. Die Prüfung des Zusammenhangs zwischen der Körpermasse und der Knorpeldicke ergab eine lineare Korrelation mit einer schwachen Steigung bei einem Korrelationskoeffizienten $R = 0,103$. Die gemessenen Unterschiede in der Knorpeldicke weisen jedoch keinen statistisch signifikanten Bezug zur Körpermasse auf ($p > 0,05$).

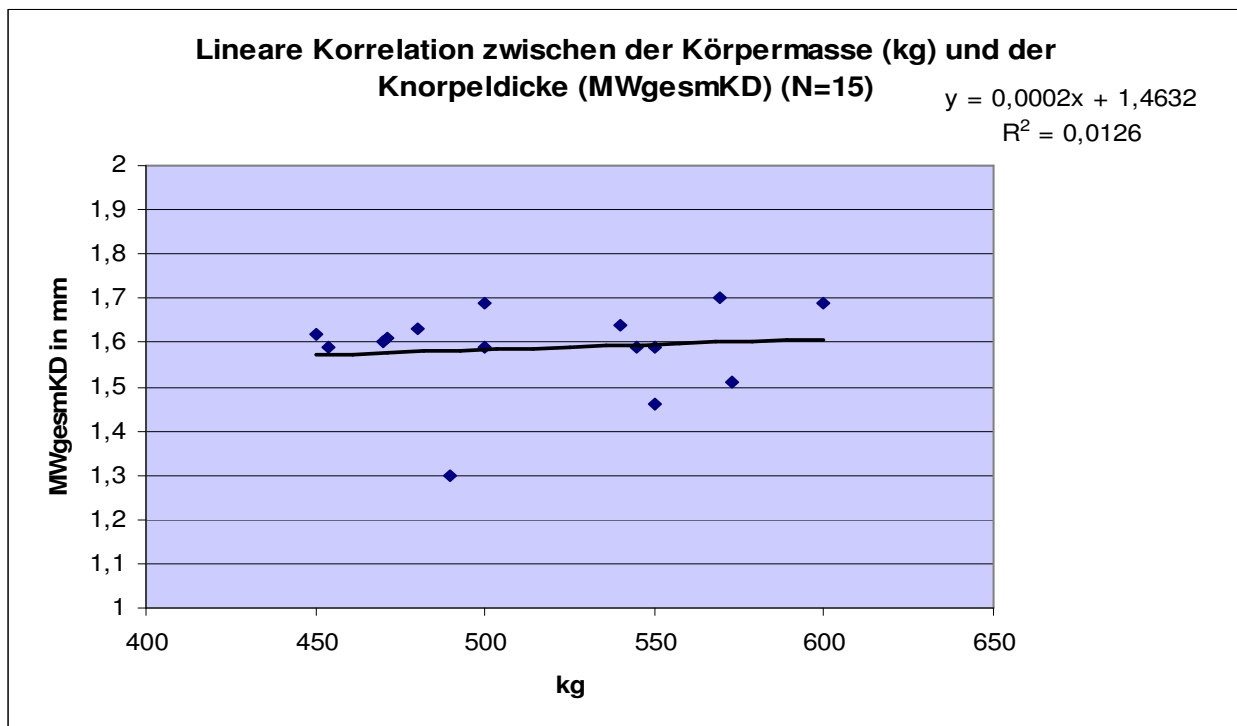


Abb. 48: lineare Korrelation zwischen der Körpermasse in kg und der Knorpeldicke in mm

IV. Diskussion

9.1 Bestimmung der Knorpelsteifigkeit

Im Rahmen der vorliegenden Studie zeigte sich, dass der mechanische Eindrückttest mit dem Gerät Artscan® 200 und der verwendeten Software Artscan® 200 Version 1.0 exakte reproduzierbare Messwerte zur Knorpelsteifigkeit am distalen Femur des Pferdes unter *in vitro* Bedingungen liefert. Bei den verwendeten Messwiederholungen unter Berücksichtigung der Relaxationszeit für Knorpelgewebe konnten reproduzierbare Messwerte mit kleiner Streuung ermittelt werden.

Zu analogen Ergebnissen kamen auch andere Untersucher. Appleyard et al. (2001) und Andric-Moser et al. (2008) zeigten bei experimentellen Messungen an eröffneten Kniegelenken von Schaf und Mensch, dass mit dem Indentermessgerät valide und reproduzierbare Messungen durchgeführt werden können.

Nach einer gewissen Einarbeitungszeit lässt sich der Tasthaken einfach handhaben. In meinen Vorstudien waren ca. 30 Messungen an mehreren Kniegelenken notwendig, um reproduzierbare Messwerte zu erhalten. Insbesondere kommt es bei der Handhabung darauf an, dass die Messsonde plan auf den Gelenkknorpel aufgesetzt und ein gleichmäßiger Druck ausgeübt wird. Als weiterer Vorteil zeigte sich, dass die Messsonde leicht zu säubern und sterilisierbar ist. Sie ermöglicht somit neben der Anwendung am Präparat den intraoperativen Einsatz bei diagnostischen Arthroskopien sowie bei *in vitro* kultiviertem Knorpelgewebe.

Der Studie von Andric - Moser (2008) zufolge ist es während der Arthroskopie aufgrund der anatomischen Gegebenheiten am humanen Kniegelenk an vielen Stellen *in vivo* nicht möglich, die Messsonde an den geplanten Messpunkten orthograd mit einer konstanten Kraft zu platzieren. Dadurch ergeben sich Rotations- bzw. Angulationsfehler, welche die Messergebnisse erheblich beeinflussen. Während der arthroskopischen Untersuchung (Töyräs et al. 2005, Andric-Moser et al. 2008), sowie unter *in vitro* Bedingungen am offenen Kniegelenk (Töyräs et al. 2005) drohte die Sonde mehrmals von der Knorpeloberfläche abzurutschen. In den vorliegenden eigenen Untersuchungen wurden analoge Erfahrungen gemacht.

Töyräs et al. (2005) entwickelten aus diesem Grunde effektiv für die Messsonde einen amorphen diamantbeschichteten Überzug, um das Abrutschen während der Messung zu

verhindern. Die Ergebnisse zur Knorpelsteifigkeit verbesserten sich signifikant, ohne dass nachweislich die oberflächliche Knorpelschicht geschädigt wurde.

Für arthroskopische Eingriffe ist das Indentermessgerät nach Brommer et al. (2006) am equinen Metakarpalgelenk nur begrenzt einsetzbar, da nicht alle Bereiche im Gelenk eingesehen und somit gemessen werden können. Die Sonde könne zwar in den Randbereichen direkte Informationen zum lokalen Gesundheitsstatus des Knorpels liefern. Areale hingegen, die für das Arthroskop unzugänglich sind, liefern nur indirekte und somit unzuverlässige Aussagen.

In der eigenen Untersuchung wurden die höchsten Werte zur Knorpelsteifigkeit an der Position A1 (abaxial im proximalen Bereich des lateralen Rollkamms) gemessen. Der niedrigste Wert zur Knorpelsteifigkeit wurde am Punkt E4 (kaudaler Bereich des medialen Femurkondylus) festgestellt. Die Abb. 26 und 27 zeigen, dass das Femoropatellargelenk insgesamt höherer Werte zur Knorpelsteifigkeit aufweist als das Femorotibialgelenk. Da das Kniescheibengelenk ein Schlittengelenk darstellt, das nach Nickel et al. (1992) proximodistale Bewegungen der Patella über die Trochlea ossis femoris ermöglicht, sind für diese Funktion hohe Knorpelsteifigkeitswerte nötig. Auffallend ist, dass die Knorpelsteifigkeit im Bereich der Trochlea ossis femoris sehr niedrig liegt. Diese Aussage stimmt mit den Ergebnissen von Athanasiou et al. (1991) überein. Diese Arbeitsgruppe untersuchte die Knorpelsteifigkeit am gesunden distalen Femur des Menschen sowie von verschiedenen Tierarten (Rind, Hund, Affe, Kaninchen). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass der Bereich der Positionen D1 und D2 zur Patella keinen oder nur geringen Kontakt hat. Die niedrigen Knorpelsteifigkeitswerte an den Positionen D1 und D2 sind wahrscheinlich für die signifikante Wechselwirkung zwischen Reihe und Position gemittelt über beide Seiten ausschlaggebend. Der Unterschied zwischen Reihen 1 und 2 könnte durch D1 und D2 positionsabhängig sein. Es wurden keine statistisch signifikanten Seitenunterschiede festgestellt. Die Seiten rechts und links können daher für weitere Signifikanzprüfungen gemittelt werden.

Obwohl die Patella in Ruhestellung durch den Fibrocartilago parapatellaris sowie durch das mediale Kniescheibenband auf dem medialen Rollkamm fixiert wird, werden im Femoropatellargelenk keine signifikanten Unterschiede in der Knorpelsteifigkeit zwischen lateral und medial festgestellt. Der Gelenkknorpel des lateralen Femurkondylus dagegen ist signifikant steifer als medial. Bislang liegen in der Literatur keine Daten vor, die diesen

Unterschied erklären könnten. Anzunehmen ist, dass sich die Unterschiede zwischen den Femurkondylen aufgrund von unterschiedlichen Belastungsverhältnissen im Wechselspiel zwischen hyalinem Gelenkknorpel und Menisken ergeben.

Im Vergleich zu den adulten Pferden zeigten eigene Untersuchungen eines 2 Wochen alten Fohlens (bisher unpublizierte Messung) eine sehr homogene Verteilung der Knorpelsteifigkeit über das gesamte Femurareal. Dieses Ergebnis stimmt mit den Untersuchungen von Brama et al. (2009) und den Aussagen von Brommer et al. (2005) über die funktionelle Anpassung des neonatalen und juvenilen Gelenkknorpels beim Pferd überein.

In der vorliegenden Studie wurden pro Messpunkt insgesamt 4 Messwerte zur Bestimmung der Knorpelsteifigkeit durchgeführt. Der Messvorgang gliederte sich in zwei Durchgänge. Pro Durchgang wurde die Sonde im Abstand von 5 Sekunden orthograd auf demselben Messpunkt platziert. Zwischen jeder Messung wurde die Sonde vollständig von der Knorpeloberfläche abgesetzt. Unmittelbar danach fiel trotzdem auf, dass in ca. 90 % der Fälle der Abdruck des Indenters im Bereich des Messpunktes makroskopisch zu erkennen war. Dieser war vor Beginn des zweiten Durchganges nicht mehr sichtbar. Signifikante Abnahmen zur Knorpelsteifigkeit konnten zwar zwischen der Messung 1 und 2 mit 2,73 % bzw. Messung 3 und 4 mit 4,48 % festgestellt werden. Durch die Gliederung in zwei Durchgänge wurde die in der Literatur angegebene Relaxationszeit für Knorpel von 1200-1800 Sekunden (Brommer et al. 2006) in jedem Falle eingehalten. Anhand dieser Erholungsphase für den Knorpel könnte die deutlich niedrige nichtsignifikante Abnahme der Knorpelsteifigkeit zwischen Durchgang 1 und 2 mit 0,85 % bzw. zwischen Messung 1 und 3 mit 0,02 % erklärt werden.

In der Studie von Engl et al. (2007) wichen die Messergebnisse zur Knorpelsteifigkeit am equinen Talus nach mehrmaligen aufeinander folgenden Messungen an einer Stelle deutlich voneinander ab. Die Knorpelsteifigkeit nahm an 95 % der gemessenen Punkte von der ersten bis zur dritten Messung signifikant ab. Die Autorin begründet diese Abnahme mit einer wahrscheinlichen Zerstörung der tangentialen Anordnung der Kollagenfasern an der Knorpeloberfläche und berücksichtigte daher in der Auswertung nur die Ergebnisse der ersten beiden Messungen.

Diese Trendveränderungen bestätigen die Vermutung, dass viele kurz hintereinander durchgeführte Messungen die Werte zur Knorpelsteifigkeit beeinflussen.

Meiner Ansicht nach sind die Proteoglykane aufgrund ihrer osmotisch wirksamen Kräfte für die Wiederherstellung der makroskopisch intakten Knorpeloberfläche verantwortlich. Dies würde die Aussagen von Rolauffs et al. (2002) und Baldassari et al. (2007) bestätigen und bedeuten, dass bei der Indentermessung vor allem die superfizielle Kollagenschicht aber auch die Proteoglykane in geringer Form beteiligt sind.

9.2 Bestimmung der Knorpeldicke

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, Referenzwerte zur Knorpeldicke am gesunden Gelenkknorpel des distalen Femur mit dem Ultraschall zu bestimmen. Die Knorpeldicke variierte am rechten Femur zwischen 0,704 mm am Punkt A1 (abaxial im proximalen Bereich des lateralen Rollkammes) und 2,838 mm an der Position E3 (kranialer Bereich des medialen Femurkondylus). Am linken Knie wurde der Minimalwert am Punkt G1 (abaxial im proximalen Bereich des medialen Rollkammes) gemessen, das Maximum mit 2,824 mm wurde ebenfalls am Punkt E3 (kranialer Bereich des medialen Femurkondylus) festgestellt.

Die eigenen Messwerte sind mit den histologisch bei Pferden ermittelten Ergebnissen von Friesbie et al. (2000; s. Tab. 4 beim Pferd) nahezu identisch.

Die beiden graphischen Darstellungen zur Knorpeldicke (Abb. 30/31) verhalten sich genau umgekehrt zur Knorpelsteifigkeit. Der Verlauf ist bogenförmig. Das heißt von Position A nach D nimmt die Knorpeldicke zu und nach G hin wieder ab. Der Bereich der Trochlea ossis femoris, besonders die Positionen C1 und C2 zeigen sehr hohe Werte zur Knorpeldicke. Der Gelenkknorpel hat hier wahrscheinlich bei geringer Druckbelastung durch die Patella vor allem durch seine deutlich ausgeprägte Dicke stoßdämpfende und puffernde Eigenschaften. Als Gleitfläche für die Kniescheibe sind in diesem Bereich optimale Verhältnisse vorhanden.

Außer an der Position B ist gemittelt über sämtliche Positionen und die beiden Seiten von Reihe 1 nach Reihe 4 eine Zunahme der Knorpeldicke festzustellen. Vor allem der mediale Femurkondylus zeigt besonders hohe Werte zur Knorpeldicke (1,322 – 2,838 mm). Der equine Gelenkknorpel ist also im Bereich des medialen Femurkondylus dicker als am lateralen Kondylus. Anzunehmen ist, dass der mediale Femurkondylus einer kontinuierlichen statischen Belastung durch das Körpergewicht ausgesetzt ist. Durch die ausgeprägte Knorpeldicke kann der Gelenkknorpel stossdämpfend wirken. Diese Ergebnisse stimmen mit den Aussagen von Athanasiou et al. (1991) und Froimson et al. (1997) überein. Athanasiou et al. (1991)

untersuchten neben dem humanen distalen Femur die Kniegelenke von mehrere Tierarten (Rind, Hund, Affe, Kaninchen). In der Studie von Froimson et al (1997) wurden die Ergebnisse an nahezu gesunden humanen Kniegelenken ermittelt.

Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass der Knorpel im Femoropatellargelenk lateral dicker ist als medial. Die Richtungsunterschiede zwischen lateral und medial sind in den Abb. 32/33 zu erkennen. Dietz und Rijkenhuizen (1999) beschreiben, dass die Osteochondrose des Kniescheibengelenks besonders am lateralen Rollkamm des Os femoris und an der Gelenkfläche der Patella auftritt. Wahrscheinlich ist der laterale Rollkamm durch das Gleiten der Patella stärkeren Druckbelastungen ausgesetzt. Der Gelenkknorpel ist in diesem Bereich dicker aber den vorliegenden Ergebnissen zufolge nicht steifer. Kommt es in diesem Bereich zu Störungen der enchondralen Ossifikation, ist der hyaline Knorpel am lateralen Rollkamm gegenüber Druckbelastungen wenig widerstandsfähig. Das Auftreten einer Osteochondrose ist somit nicht mehr verwunderlich.

Bei der statistischen Prüfung wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Seiten festgestellt, daher können die Seiten rechts und links gemittelt werden. Es bestehen signifikante Unterschiede zwischen den Reihen und den einzelnen Position. Eine auffallende signifikante Wechselwirkung wurde unter Berücksichtigung der Position D in den Reihen 1 und 2 zwischen Seite und Position ermittelt. Weil diese Wechselwirkung ohne D1 und D2 (proximaler und distaler Bereich der Trochlea ossis femoris) nicht signifikant ist, scheint D wahrscheinlich aufgrund der hohen Knorpeldickenwerte eine entscheidende Rolle zu spielen.

In der vorliegenden Arbeit wurde nicht dieselbe Methode zur Bestimmung der Knorpeldicke wie in der Dissertation von Engl et al. (2007) verwendet. Bei der Untersuchung von Engl et al. (2007) variierte die Knorpeldicke bei 35 adulten Pferden am Talus zwischen 0,47 – 1,08 mm. Die vorliegenden eigenen Untersuchungen lieferten am distalen Femur Werte zwischen 0,682 – 2,832 mm. Die Anwendung der Messlupe liefert zwar eindeutige reproduzierbare Werte. Hierzu muss aber das Gelenk genau senkrecht zur Knorpeloberfläche aufgesägt werden, um einen für die Knorpeldicke auswertbaren realen Querschnitt zu erhalten. Dies gestaltete sich aufgrund von Größe und Umfang des equinen Kniegelenkes sowie den gewunden Gelenkflächen inklusive beidseitiger Trochleakämme und Gleitfläche der Patella als praktisch nicht durchführbar.

In eigenen Untersuchungen konnte bei einem 2 Wochen alten Fohlen im Bereich des medialen Trochleakammes eine Knorpeldicke von 18 mm gemessen werden (Daten bisher nicht

veröffentlicht). Dabei erwies sich die Real-time-Sonographie zur Bestimmung der Knorpeldicke als nicht geeignet. Der in der vorliegenden Studie verwendete Linearschallkopf inklusive der Vorlaufstrecke war für den Trochleabereich des distalen Femur sowie für die beiden Rollkämme zu groß. Gemessen wurde die Knorpeldicke mit einem Lineal mit Millimeterskalierung jeweils an den für den DMMB-Assay ausgestanzten Knorpel-Knochenzylindern.

Nach neuen Studien (Laasanen et al. 2003) zufolge soll für den Einsatz in der Arthroskopie ein Tasthaken mit integrierter Ultraschallsonde entwickelt werden, um auf diese Weise die Knorpeldicke in die „Indentermessung“ mit einzubeziehen. Zusätzlich könnte das Ultraschallbild wichtige Informationen über Struktur und Intaktheit der Knorpeloberfläche liefern (Töyräs et al. 1999). Diese Informationen wären nach Nieminen et al. (2001) wichtig, da beginnende pathologische Veränderungen im Kollagen-Netzwerk den so genannten „point of no return“ der fortschreitenden Osteoarthritis darstellen.

9.3 Der Einfluss der Knorpeldicke auf die Messwerte zur Knorpelsteifigkeit

Bei der vorliegenden Arbeit ergab sich die Fragestellung, ob die Knorpeldicke die Indentermessung verfälscht. Aufgrund der identischen Messpunkte für Knorpelsteifigkeit und -dicke ist ein direkter Vergleich möglich.

In der eigenen Studie wurden bei adulten Pferden hohe Werte zur Knorpelsteifigkeit bei dünnem Gelenkknorpel und eine niedrige Knorpelsteifigkeit bei dickem Gelenkknorpel gemessen (s. Tab. 4/5 sowie 7/8). Diese Ergebnisse stimmen mit den Messwerten der Vorläuferstudie am Talus von Pferden von Engl et al. (2007) überein. In dieser Arbeit verhält sich die Knorpelsteifigkeit von proximal nach distal abnehmend, die Knorpeldicke dagegen nimmt von proximal nach distal zu.

Wird die Abhängigkeit zwischen der Knorpelsteifigkeit und der Knorpeldicke genauer untersucht, so zeigt sich, dass die Art der Betrachtung für diese Untersuchung eine wichtige Rolle spielt. Werden die Variablenpaare Knorpelsteifigkeit und Knorpeldicke getrennt nach der Lokalisation, aber die Seiten rechts und links in einem Plot zusammengefasst, entstehen für die Positionen B1, C1, D1, D2, G2, F3, G4 signifikante lineare Korrelationen (Abb. 40).

Shepherd et al. (1999), Korhonen et al. (2002) sowie Appleyard et al. (2003) bestätigen ebenfalls an den untersuchten Kniegelenken von Mensch, Hund und Schaf das gegensätzliche Verhalten von Knorpelsteifigkeit und Knorpeldicke. Im Unterschied dazu korreliert in der Studie von Athanasiou et al. (1991) die Knorpelsteifigkeit nicht mit der Knorpeldicke. Diese Arbeitsgruppe untersuchte die Kniegelenke von 5 verschiedenen Spezies (Rind, Hund, Mensch, Affe, Kaninchen). Räsänen und Messner et al. (1996) fanden beim Kaninchen hohe Werte der Knorpelsteifigkeit vorkommend bei dickem Gelenkknorpel.

Bei der durchgeführten Pseudoreplikation (Abb. 45) entstand ein signifikanter nicht linearer Zusammenhang zwischen Knorpeldicke und Knorpelsteifigkeit ($p < 0,001$). Aus der Abb. 41 ergibt sich folgender Zusammenhang: In Bereichen mit geringer Knorpeldicke ($< 1,0$ mm) entstehen überproportional große Werte zur Knorpelsteifigkeit. Zwischen den Werten $1,0 - 2,6$ mm ist der Zusammenhang zwischen Knorpeldicke und Knorpelsteifigkeit nahezu linear. Mit zunehmender Knorpeldicke nehmen die Messwerte zur Knorpelsteifigkeit ab. Ab hohen Knorpeldickenwerten ($> 2,6$ mm) erscheint es, als ob sich die Knorpelsteifigkeitswerte einem konstanten Wert ($0,3$ N) annähern würden.

Da in der eigenen Untersuchung (Tab. 4/5) in den Randbereichen der femoralen Rollkämme (Position A und G) die Knorpeldicke generell $< 1,0$ mm liegt, sind diese Ergebnisse fraglich. In der vorliegenden Arbeit wurde ein konvex geformter Indenter verwendet. In diesem Fall wird angenommen, dass die Messsonde den subchondralen Knochen mitregistriert und ungenaue Werte zur Knorpelsteifigkeit liefert. Der Korrekturfaktor „k“ nimmt bei dünnem Knorpel überproportional zu. Diese Vermutung wurde anhand einer eigenen Untersuchung bestätigt, indem der Knorpel an 5 Kniegelenken jeweils im Bereich des lateralen Rollkammes der Trochlea ossis femoris vom subchondralen Knochen abpräpariert, und die Steifigkeit am knorpelfreien Areal gemessen wurde. Die Werte waren im Vergleich zu den bisher untersuchten Knorpelarealen deutlich erhöht (Daten nicht veröffentlicht).

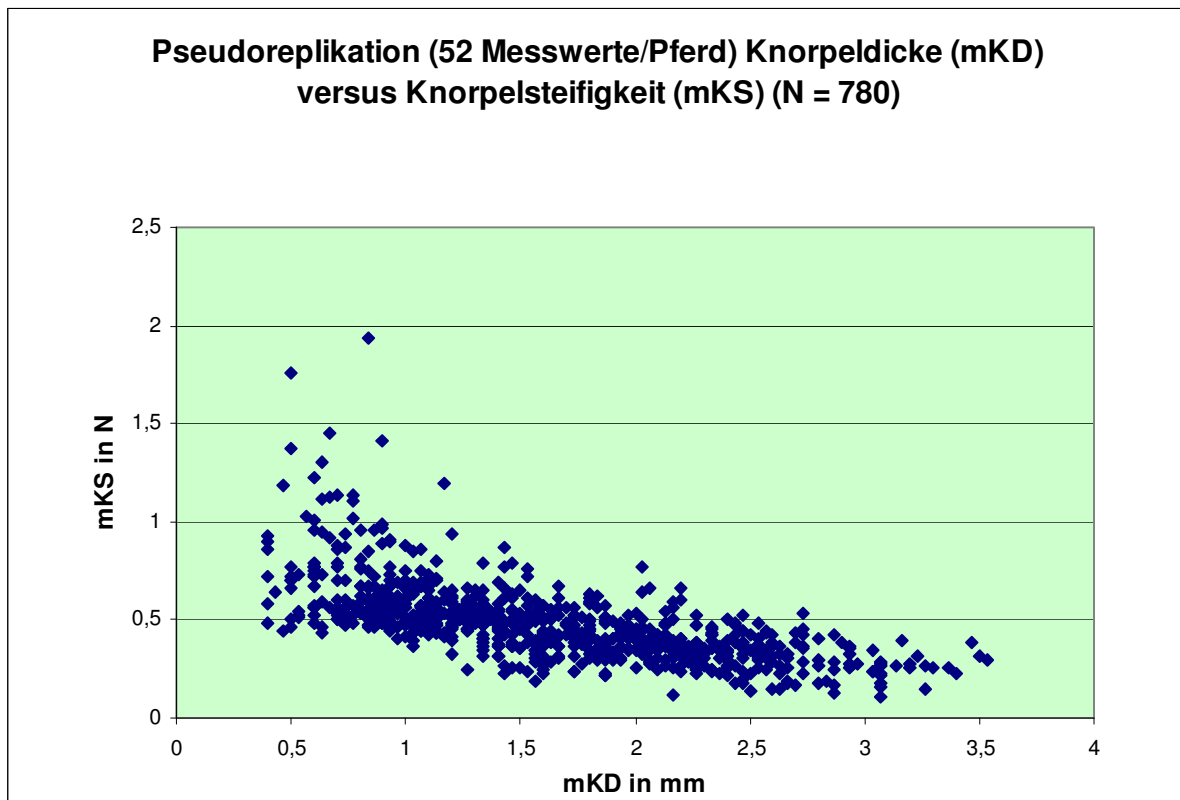


Abb. 45: Darstellung der Beziehung zwischen der Knorpeldicke in mm und der Knorpelsteifigkeit in N (52 Messwerte/Pferd; Pseudoreplikation)

Im ähnlich verlaufenden Schema nach Lyyra et al. (1999) (Abb. 49) wird der Einfluss der Knorpeldicke auf die Indentermessung gezeigt. Es ergibt sich eine sehr ähnliche Übereinstimmung der Kurven.

Problematisch ist nach Lyyra et al. (1999) die Messung von Knorpelmaterial, das eine Dicke < 2 mm aufweist. In diesem Fall nimmt der systemische Messfehler aufgrund der geringen Knorpeldicke signifikant zu, da der Widerstand des subchondralen Knochens von der Messsonde registriert wird. Die Werte zur Knorpelsteifigkeit sind bei dünnem Knorpel stark erhöht. Lyyra et al. (1999) verwendeten für ihre Studie eine Aufdruckskraft von 10 Newton sowie einen planen zylinderförmigen Indenter mit einer Größe von $300 \mu\text{m}$.



SINGLE-PHASE ISOTROPIC ELASTIC MODEL

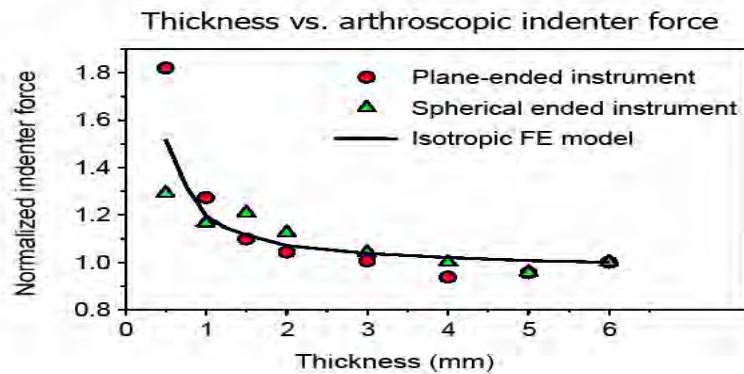


Abb. 49: Einfluss der Knorpeldicke auf die Indentermessung nach Lyyra et al. (1999)

Durch die Arbeitsgruppe um Lyyra wurden aus diesem Grund nachträgliche Veränderungen der einzelnen Komponenten vorgenommen, sowie das System mit Hilfe der *Finite – Elemente - Methode* verbessert (Lyyra et al. 1999). Durch die Verwendung eines kleineren, kugelförmigen Indenters, der eine Verformung der Knorpeloberfläche um 100 μm verursacht, ist es möglich, die Aufdruckskraft zu minimieren (2 Newton) und somit dünneren Knorpel zu messen. Für das verwendete Gerät sind konstante Messergebnisse nach Lyyra et al. (1999) ab einer Knorpeldicke von 1,2 mm zu erwarten.

Nach Brommer et al. (2006) wird die Indentermessung durch unterschiedliche Knorpeldicken um bis zu 42 % beeinflusst. Auch Laasanen et al. (2003) bestätigen die Aussage, dass die Knorpeldicke die Ergebnisse zur Knorpelsteifigkeit bei der Indentermethode entscheidend modifiziert. Bei diesen Autoren wurden in der Literatur keine Grenzbereiche zur Knorpeldicke angegeben.

Die eigenen Untersuchungen berechtigen zu der Annahme, dass bei dem gewählten Untersuchungsverfahren ab einer Knorpeldicke unter 1 mm Verfälschungen der ermittelten Knorpelsteifigkeit auftreten können. Der quantitative Einfluss der Knorpeldicke auf die Knorpelsteifigkeitswerte zeigt anhand des gepoolten Regressionskoeffizienten, dass die Knorpelsteifigkeit ohne die Positionen D1 und D2 in den Reihen 1-4 pro Millimeter Knorpeldickenzunahme um 0,073 N signifikant abnimmt. Für die Reihen 1-2 mit den Positionen D1 und D2 wurde eine signifikante Abnahme um 0,098 N pro Millimeter zunehmender Knorpeldicke festgestellt.

9.4 Ergebnisse zum Glykosaminoglykangehalt

Die Messwerte zum Glykosaminoglykangehalt ergeben am rechten Femur am Punkt F2 (distaler Scheitelpunkt des medialen Rollkammes) ein Minimum von 23,128 µg/mg und an der Position F4 (kaudaler Bereich des medialen Femurkondylus) einen Maximalwert von 37,484 µg/mg. Am linken Femur variiert der Glykosaminoglykangehalt zwischen 21,638 µg/mg ebenfalls am Punkt F2 (distaler Scheitelpunkt des medialen Rollkammes) und 37,896 µg/mg an der Position B3 (kranialer Bereich des lateralen Femurkondylus). Der Glykosaminoglykangehalt unterscheidet sich in den Reihen 1-4 signifikant. Auffallend ist, dass ohne Berücksichtigung der Position D (Trochlea ossis femoris) signifikante Unterschiede zwischen den Positionen festgestellt werden. Werden dagegen nur die Reihen 1 und 2 im Femoropatellargelenk mit der Position D (Trochlea ossis femoris) berücksichtigt, fallen die signifikanten Unterschiede weg. Anhand der Abb. 34/35 scheinen die hohen Glykosaminoglykangehalte in den Reihen 3-4 (Femorotibialgelenk) eine Rolle zu spielen.

9.5. Ergebnisse zum Kollagengehalt

Die Untersuchung zum Kollagengehalt ergab am rechten Femur an der Position F4 (kaudaler Bereich des medialen Rollkammes) ein Minimum des Hydroxyprolinwertes von 8,449 µg/mg und am Messpunkt B2 (distaler Scheitelpunkt des lateralen Rollkammes) einen Maximalwert von 13,862 µg/mg. Am linken Femur variiert der Hydroxyprolingealt zwischen 8,987 µg/mg ebenfalls am Punkt D1 (proximaler Bereich der Trochlea ossis femoris) und 14,423 µg/mg an der Position F2 (distaler Scheitelpunkt des medialen Rollkammes). Die entsprechenden Kollagengehalte lassen sich durch Multiplikation mit dem Faktor 7,4 rechnerisch bestimmen.

Der Hydroxyprolingealt unterscheidet sich in den Reihen 1-4 signifikant. Auffallend ist, dass unter Berücksichtigung der Position D (Trochlea ossis femoris) keine signifikante Unterschiede festgestellt werden. Erklärung hierfür könnte sein, dass nur die Reihen 1 und 2 im Femoropatellargelenk berücksichtigt werden.

Weiterhin zeigt sich, dass signifikante Unterschiede zwischen den Positionen nachgewiesen werden, wenn nur die Reihen 1 und 2 mit den Positionen D 1 und D2 (Trochlea ossis femoris) betrachtet werden. Die signifikanten Unterschiede fallen weg, wenn die Reihen 1-4 ohne die Position D (Trochlea ossis femoris) untersucht werden. Die Abb. 38/39 zeigen, dass der

Hydroxyprolingehalt im Bereich der Trochlea ossis femoris deutlich niedriger ist. Dies könnte für dieses Ergebnis erklärend sein.

9.6 Vergleich Knorpelsteifigkeit bzw. Knorpeldicke mit den Knorpelbestandteilen Glykosaminoglykan und Kollagen

Bei den vorliegenden Messungen zum Kollagengehalt wurde für den gesamten Femur (Reihen 1-4) ohne die Position D (Trochlea ossis femoris) festgestellt, dass pro Millimeter Knorpeldickenzunahme eine Abnahme des Hydroxyprolingehaltes um 0,816 µg/mg Knorpel erfolgt. Für das Femoropatellargelenk (Reihen 1-2) mit den Positionen D1 und D2 entsteht anhand des gepoolten Regressionskoeffizienten eine Abnahme um 0,607 µg/mg Knorpel pro Millimeter Knorpeldicke.

Mit $p < 0,013$ wirkt sich der Hydroxyprolingehalt signifikant auf die Messwerte zur Knorpelsteifigkeit aus. Mit zunehmendem Hydroxyprolingehalt steigen die Werte zur Knorpelsteifigkeit. Zwischen beiden Messgrößen konnte ein positiver Korrelationskoeffizienten $R=0,144$ berechnet werden.

Es ist aus der Literatur bekannt, dass in der superfiziellen Knorpelschicht ein hoher Gehalt an parallel angeordneten Kollagenfasern vorliegt (Otte, P. 2000). Hyttinen et al. (2009) stellten bei ihrer Studie am equinen Metakarpalgelenk von juvenilen Tieren fest, dass ein hoher Gehalt an parallel angeordneten Kollagenfasern in stark belasteten Gelenkarealen optimalen Widerstand gegenüber intermittierendem Stress bietet. Dementsprechend lassen sich auch die eigenen Ergebnisse dahingehend interpretieren, dass die oberflächliche Kollagenschicht den größten Einfluss auf die Knorpelsteifigkeitsmessung hat.

Bei einer verwendeten Aufdruckkraft von 3 N konnte kein Zusammenhang zwischen den Messwerten zur Knorpelsteifigkeit und dem Glykosaminoglykangehalt nachgewiesen werden. Der Vergleich zwischen Knorpeldicke und Glykosaminoglykangehalt bei den eigenen Messungen ergibt keinen nachweisbaren signifikanten Effekt. Literaturangaben zufolge (Rolauffs et al. 2002, Hyttinen et al. 2009) spielen Glykosaminoglykane erst bei physiologischer Gewichtsbelastung (20 MPa am humanen Knie- und Hüftgelenk gemessen) eine entscheidende Rolle für die stoßdämpfende Funktion des Knorpels.

9.7 Zusammenhang zwischen der Knorpeldicke und der Körpermasse der Pferde

In der vorliegenden Studie konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Knorpeldicke und der Körpermasse festgestellt werden (s. Abb. 44).

V. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Referenzwerte zur Knorpelsteifigkeit und Knorpeldicke des Kniegelenkes am distalen Femur von adulten gesunden Pferden zu ermitteln. Zusätzlich wurden die Knorpelbestandteile Glykosaminoglykane und Kollagen bestimmt. Diese Messergebnisse sowie die Korrelation der einzelnen Messdaten sollen als Grundlage in der Arthroseforschung am Pferd verwendet werden. Die eigenen Untersuchungen hatten folgende Zielstellung:

- 1.) Bestimmung von Referenzwerten zur Knorpelsteifigkeit und Knorpeldicke in verschiedenen Arealen des Femoropatellar- und Femorotibialgelenkes am distalen Femur beim Pferd.
- 2.) Es ist zu prüfen, wie hoch die Knorpelsteifigkeit und die Knorpeldicke in verschiedenen Arealen des Kniegelenkes sind.
- 3.) Im Bereich der gemessenen Knorpelareale soll quantitativ der Glykosaminoglykan- und der Kollagengehalt bestimmt werden.
- 4.) Untersucht werden soll die Korrelation zwischen der Knorpelsteifigkeit und der Knorpeldicke sowie den Knorpelbestandteilen Glykosaminoglykane und Kollagen (Abb. 1).
- 5.) Es ist zu prüfen, welchen Einfluss die Messmethode einer vierfachen Messung am gleichen Punkt auf die Messergebnisse zur Knorpelsteifigkeit besitzt.

Untersucht wurde der gesunde Gelenkknorpel des Femoropatellar- und des Femorotibialgelenkes am distalen Femur von 15 euthanasierten Warmblutpferden. Für die vorliegende Studie wurde ein von der Arbeitsgruppe um Lyyra entwickeltes Nachfolgemodell (Artscan® 200) mit dem Computerprogramm Artscan® 200 Version 1.0 verwendet. Die Gelenkflächen am distalen Femur wurden an 26 Messpunkten bezüglich der Knorpelsteifigkeit und der Knorpeldicke untersucht (Abb. 15). Die sonographisch ermittelte Knorpeldicke wurde definiert als der Abstand zwischen der Knorpeloberfläche und der auf dem Monitor sichtbaren hyperechogenen Reflexzone des subchondralen Knochens. Für die sonographische Untersuchung wurde das Real-Time Ultraschallgerät LOGIQ TM 500 PRO Series der Fa. GE Medical Systems, Milwaukee, Wisconsin (USA) verwendet. Zur Bestimmung der Knorpeldicke kam ein Linearschallkopf vom Typ 739L (Abb. 17) zum Einsatz. Bei der Bestimmung des Proteoglykangehaltes wurde quantitativ der Gehalt an sulfatierten Glykosaminoglykanen

bestimmt, beruhend auf dem *Verfahren nach Farndale*. Diese Untersuchung erfolgte an 10 verschiedenen Messpunkten (Abb. 19). Der Hydroxyprolingehalt wurde ebenfalls an 10 Positionen bestimmt (Abb. 19) und nach dem Verfahren von Woessner (1961) in einer modifizierten Art nach Stegemann und Stalder (1967) ermittelt. Der quantitative Kollagengehalt wurde aus dem Hydroxyprolinanteil mit dem Faktor 7,4 berechnet.

Für die rechte distale Femurhälfte schwankt die Knorpelsteifigkeit zwischen 0,264 N am Punkt E4 (kaudaler Bereich des medialen Femurkondylus) und 1,065 N am Punkt A1 (abaxial im proximalen Bereich des lateralen Rollkammes) (Tab. 6). Auffallend ist, dass der Minimalwert am linken Femur von 0,202 N ebenfalls am Punkt E4 (kaudaler Bereich des medialen Femurkondylus) sowie der Maximalwert von 0,834 N an der Position A1 (abaxial im proximalen Bereich des lateralen Rollkammes) auftreten (Tab. 7). Beide graphischen Darstellungen (Abb. 26/27) zeigen einen „wannenförmigen“ Verlauf. Die Knorpelsteifigkeit ist im Bereich des lateralen Kondylus signifikant höher als medial (Abb. 28/29). Im Femoropatellargelenk wurden höhere Werte zur Knorpelsteifigkeit bestimmt als im Femorotibialgelenk.

Die Knorpeldicke am rechten Knie schwankt zwischen 0,704 mm am Punkt A1 (abaxial im proximalen Bereich des lateralen Rollkammes) und 2,838 mm am Punkt E3 (kranialer Bereich des medialen Femurkondylus). Die Knorpeldicke am linken Knie variiert zwischen 0,682 mm am Punkt G1 (abaxial im proximalen Bereich des medialen Rollkammes) und 2,824 mm ebenfalls am Punkt E3 (kranialer Bereich des medialen Femurkondylus). Die Werte zur Knorpeldicke ergeben, dass der Knorpel im Femoropatellargelenk lateral signifikant dicker als medial ist. Im Femorotibialgelenk dagegen werden höhere Knorpeldickenwerte im Bereich des medialen Femurkondylus festgestellt als lateral (Abb. 34/35).

Am rechten Knie wurde ein Glykosaminoglykangehalt zwischen 23,128 µg/mg Knorpel am Punkt F2 (distaler Scheitelpunkt des medialen Rollkammes) und 37,484 µg/mg Knorpel am Punkt F4 (kaudaler Bereich des medialen Kondylus) gemessen (Tab. 12). Am linken Knie schwanken die Werte zwischen 21,638 µg/mg Knorpel am Punkt F2 (distaler Scheitelpunkt des medialen Rollkammes) und 37,896 µg/mg Knorpel am Punkt B3 (kranialer Bereich des lateralen Femurkondylus) (Tab. 13).

Der Hydroxyprolingehalt am rechten Knie variiert zwischen 8,449 µg/mg Knorpel am Punkt F4 (kaudaler Bereich des medialen Femurkondylus) und 13,862 µg/mg Knorpel am Punkt B2 (distaler Scheitelpunkt des lateralen Rollkammes) (Tab. 15). Am linken Knie wurden Werte

zwischen 8,987 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Knorpel am Punkt D1 (proximaler Bereich der Trochlea ossis femoris) und 14,423 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Knorpel am Punkt F2 (distaler Scheitelpunkt des medialen Rollkammes) ermittelt (Tab. 16).

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand des gepoolten Regressionskoeffizienten nachgewiesen werden, dass die Knorpelsteifigkeit ohne die Positionen D1 und D2 (Trochlea ossis femoris) in den Reihen 1-4 pro zunehmender Knorpeldicke in mm um 0,073 N signifikant abnimmt. Für die Reihen 1-2 mit den Positionen D1 und D2 (Trochlea ossis femoris) wurde ebenfalls eine signifikante Abnahme um 0,098 N pro mm zunehmender Knorpeldicke festgestellt. Wird die Abhängigkeit zwischen der Knorpelsteifigkeit und der Knorpeldicke genauer untersucht, zeigt sich, dass die Art der Betrachtung für diese Untersuchung eine wichtige Rolle spielt. Werden die Variablenpaare Knorpelsteifigkeit und Knorpeldicke getrennt nach der Lokalisation, aber die Seiten rechts und links in einem Plot zusammengefasst, entstehen für die Positionen B1, C1, D1, D2, G2, F3, G4 signifikante lineare Korrelationen (Abb. 44). Bei der Pseudoreplikation (Abb. 45), entsteht ein nicht linearer Zusammenhang. Bei dünnem Knorpel ($<1,0$ mm) werden hohe Werte zur Knorpelsteifigkeit gemessen. Zwischen den Bereichen 1,0-2,6 mm Knorpeldicke erscheint die Korrelation linear. Ab einer hohen Knorpeldicke ($>2,6$ mm) nähert sich die Kurve einem nahezu konstanten Wert von 0,3 N an.

Mit zunehmendem Hydroxyprolinegehalt steigen die Werte zur Knorpelsteifigkeit bei einem Korrelationskoeffizienten $R=0,144$ signifikant an ($p<0,013$; Abb. 46). Für die Reihen 1-4 ohne die Position D (Trochlea ossis femoris) wurde festgestellt, dass pro Millimeter Knorpeldickenzunahme eine Abnahme des Hydroxyprolinegehaltes um 0,816 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Knorpel erfolgt. Für die Reihen 1-2 mit den Positionen D1 und D2 (Trochlea ossis femoris) entsteht anhand des gepoolten Regressionskoeffizienten eine Abnahme um 0,607 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Knorpel pro Millimeter Knorpeldicke.

Der Vergleich zwischen Knorpeldicke und Glykosaminoglykangehalt bei den eigenen Messungen ergibt keinen nachweisbaren signifikanten Effekt. Ebenso konnte bei einer verwendeten Aufdruckkraft von 3 N kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Messwerten zur Knorpelsteifigkeit und dem Glykoaminoglykangehalt nachgewiesen werden. Abb. 48 zeigt, dass mit $p>0,05$ kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Knorpeldicke und der Körpermasse gemittelt über die Seiten rechts und links existiert.

Deutliche Abnahmen zur Knorpelsteifigkeit konnten zwar zwischen der Messung 1 und 2 mit 2,73 % bzw. Messung 3 und 4 mit 4,48 % festgestellt werden. Beim Vergleich der

Knorpelsteifigkeit zwischen dem ersten und zweiten Durchgang ergab sich jedoch nur eine Reduzierung der Werte um 0,85 %. Durch die Gliederung in zwei Durchgänge wurde die in der Literatur angegebene Relaxationszeit für Knorpel von 1200-1800 Sekunden (Bommer et al. 2006) in jedem Falle eingehalten. Anhand dieser Erholungsphase für den Knorpel könnte die geringe Abnahme der Knorpelsteifigkeit zwischen Durchgang 1 und 2 erklärt werden. In einer nachträglichen Untersuchung wurden ebenfalls geringe Abnahmen zur Knorpelsteifigkeit mit 0,02 % zwischen den Messungen 1 und 3 nachgewiesen. Diese Trendveränderungen bestätigen die Vermutung, dass viele kurz hintereinander durchgeführte Messungen die Werte zur Knorpelsteifigkeit beeinflussen.

Schlußfolgerung:

Anhand der ermittelten Ergebnisse kann festgestellt werden, dass sich die Parameter Knorpelsteifigkeit und Knorpeldicke bei gesunden Gelenken offensichtlich an die Gelenkphysiologie anpassen. Während des Wachstums kommt es durch Differenzierungsprozesse zu Veränderungen in der Knorpelsteifigkeit und der Knorpeldicke.

Die Knorpelsteifigkeit und die Knorpeldicke verhalten sich unter Berücksichtigung der Betrachtungsweise gegensätzlich. Die Knorpeldicke beeinflusst die Werte zur Knorpelsteifigkeit entscheidend und sollte daher bei der Indentermessung immer berücksichtigt werden. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass erst ab einer Knorpeldicke >1 mm realistische Werte zur Knorpelsteifigkeit entstehen.

Mit zunehmendem Kollagengehalt stiegen in der Untersuchung die Knorpelsteifigkeitswerte signifikant an. Daraus kann auch anhand bereits bestehender Literatur abgeleitet werden, dass bei der Indentermessung eine intakte superfizielle Kollagenschicht eine entscheidende Rolle spielt. Auffallend war, dass zwischen dem Glykoaminoglykangehalt und den Parametern Knorpelsteifigkeit sowie der Knorpeldicke keine signifikanten Abhängigkeiten festgestellt wurden. Auch der Einfluß der Körpermasse auf die Knorpeldicke am gesunden Kniegelenk ist unwesentlich. Die eigenen praktischen Erfahrungen an Gelenkpräparaten bestätigen die Literaturmeinung, dass das Gerät der Firma Artscan medical innovations aufgrund zahlreicher nicht oder nur schwer beherrschbarer Fehlerquellen für die Arthroskopie ungeeignet erscheint. Demgegenüber ist dieses Messsystem für wissenschaftliche Studien an Präparaten verwendbar. Für den intraoperativen Einsatz sind weitere Forschungs- und technische Entwicklungsstrategien notwendig.

VI. Summary

This research had the following aim to define authoritative values to cartilage stiffness and cartilage thickness of the knee joint on the distal femur of adult healthy horses. In addition the cartilage components glycosaminoglykans and collagen were determined. These measuring results as well as the correlation of the single measuring data should be used as a basis in equine Arthrosis research. My research has the following aim position:

- 1.) Defining of authoritative values to cartilage stiffness and cartilage thickness in different areas of the femoropatellar- and femorotibial joint on distal femur of the horse.
- 2.) The results were checked, how high cartilage stiffness and cartilage thickness are in different areas of the knee joint.
- 3.) In the area of the measured articular cartilage the amount of glycosaminoglykans and collagen should be determined quantitatively.
- 4.) The correlation between cartilage stiffness and cartilage thickness was suggested to be examined as well as the cartilage components glycosaminoglykans and collagen (fig. 1).
- 5.) The results were checked, which influence the measuring method of a fourfold measurement has to the same point on the measuring results to cartilage stiffness.

The healthy joint cartilage of the femoropatellar- and the femorotibial joint on distal femur of 15 euthanised warmblood horses was examined. For this study a succession model (Artscan ® 200) developed by the working group around Lyyra with the computer program Artscan ® 200 versions 1.0 was used.

The joint surfaces on distal femur were determined in 26 measuring points with regard to cartilage stiffness and the cartilage thickness (fig. 15). Ultrasound measurement of cartilage thickness was defined as the distance between the cartilage surface and the visible hyperechogene reflex zone of subchondral bone on the monitor. For ultrasonographic measurement the real time ultrasound scanner TM LOGIQ 500 pro Series of Medical system, Milwaukee, Wisconsin (USA) was used. Utilizing a linear sound head of the type 739L (fig. 17) for cartilage thickness. When measuring the glycosaminoglykans we examined quantitatively the content of sulphated glykosaminoglykans, being conducted on the study of Farndale. This experiment occurred in 10 different measuring points (fig. 19). The content of hydroxyproline was also determined in 10 positions (fig. 19) based on Woessner's procedure (1961). In this case the model of Stegemann and Stalder (1967) was used. The quantitative collagen content was calculated from the hydroxyproline with the factor 7.4.

For the right part of the distal femur the cartilage stiffness varied between 0.264 Newton in the point E4 (caudal area of the medial femoral condyle) and 1.065 Newton in the point A1 (abaxial in the proximal area of the lateral rolling comb) (tab. 6). It was surprising, that the minimum value in the left femur of 0.202 Newton was measured in the point E4 (caudal in the area of the medial femoral condyle) as well as the maximum value of 0.834 Newton in the point A1 (abaxial in the proximal area of the lateral rolling comb) (tab. 7). Both graphic representations (fig. 26/27) showed a "tub-shaped" course. The cartilage stiffness was significantly higher in the area of the lateral condyle than the medial (fig. 28/29).

The cartilage thickness in the right knee varied between 0.704 mm in the point A1 (abaxial in the proximal area of the lateral rolling comb) and 2.838 mm in the point E3 (cranial area of the medial femoral condyle). Measurement of cartilage thickness in the left knee was between 0.682 mm in the point G1 (abaxial in the proximal area of the media rolling comb) and 2.824 mm in the point E3 (cranial area of the medial femoral condyle). The values to the cartilage thickness showed that the cartilage in the femoropatellar joint is lateral significantly thicker than medial. In the femorotibial joint the cartilage is thicker in the area of the medial femoral condyle than lateral (fig. 34/35).

In the right knee the measurement of glycoaminoglycans was between 23.128 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of cartilage in the point F2 (distal apex of the medial rolling comb) and 37.484 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of cartilage in the point F4 (caudal area of the medial femoral condyle) (tab. 12). In the left knee the values varied between 21.638 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of cartilage in the point F2 (distal apex of the medial rolling comb) and 37.896 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of cartilage in the point B3 (cranial area of the lateral femoral condyle) (tab. 13).

The measurement of hydroxyproline in the right knee was between 8.449 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of cartilage in the point F4 (caudal area of the medial femoral condyle) and 13.862 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of cartilage in the point B2 (distal apex of the lateral rolling comb) (tab. 15). In the left knee the values were determined between 8.987 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of cartilage in the point D1 (proximal area of the trochlea ossis femoris) and 14.423 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of cartilage in the point F2 (distal apex of the medial rolling comb) (tab. 16).

This research was able to prove with the pooled regression coefficient that cartilage stiffness decreases excluding the positions D1 and D2 (trochlea ossis femoris) in the rows 1-4 while increasing cartilage thickness in mm about 0,073 Newton significantly. For the rows 1-2 including the positions D1 and D2 (Trochlea ossis femoris) a significant decrease was also ascertained about 0,098 Newton per mm of increasing cartilage thickness. If the dependence is

more exactly examined between cartilage stiffness and the cartilage thickness, it appears that the kind of consideration plays an important role for this study. If the variable pairs of cartilage stiffness and cartilage thickness are separated after the localisation, but the sides right and left in a plot are summarised, there are significant linear correlations for the points B1, C1, D1, D2, G2, F3, G4 (fig. 44). With the pseudoreplication (fig. 45), there is a not linear correlation. High values of cartilage stiffness were measured with thin cartilage (<1.0 mm). Between the area of 1.0-2.6 mm of cartilage thickness the correlation is linear. At high cartilage thickness values (> 2.6 mm) the curve approaches to a nearly steady value of 0.3 Newton.

With increasing content of hydroxyproline the values rise to cartilage stiffness with a correlation coefficient $R = 0,144$ significantly ($p < 0,013$; fig. 46). For the rows 1-4 excluding point D (trochlea ossis femoris) it was found out that per millimetre of increasing cartilage thickness a decrease of hydroxyproline occurs around $0,816 \mu\text{g}/\text{mg}$ of cartilage. For the rows 1-2 including point D1 and D2 (trochlea ossis femoris) there is a decrease with the help of the pooled regression coefficient around $0,607 \mu\text{g}/\text{mg}$ of cartilage per millimetre of cartilage thickness.

The comparison between cartilage thickness and glycosaminoglycans showed no provable significant effect. No significant correlation could be proved with a used pressure by 3 Newton between the measuring values to cartilage stiffness and glycosaminoglycans.

Fig. 48 showed that with $p > 0.05$ no significant correlation exists between cartilage thickness and the body mass averaged from the right and left side.

Cartilage stiffness decreases significantly between the measurement 1 and 2 with 2,73 % or measurement 3 and 4 with 4,48 %. Nevertheless, with the comparison of cartilage stiffness between the first and second passageway a not significant reduction of the values arose about 0,85%. By the arrangement in two passageways the time of relaxation suggested in the literature for cartilage of 1200-1800 seconds (Bommer et al. In 2006) was kept in every case. With the help of this recreational phase for cartilage the low decrease of cartilage stiffness could be explained between passageway 1 and 2. In an additional study low decreases were also proved to cartilage stiffness between the measurements 1 and 3. These trend changes confirm the supposition that many briefly measurements influence the values to the cartilage stiffness.

Conclusion:

The parameters of cartilage stiffness and cartilage thickness adapt themselves with healthy joints obviously to the joint physiology. While growing there are changes to cartilage stiffness and cartilage thickness by differentiation processes.

Cartilage stiffness and cartilage thickness behave oppositional taking the approach into account. The cartilage thickness influences the values to cartilage stiffness decisively and, hence, should always be considered with the indenter measurement. The study showed that only from a cartilage thickness > 1 mm there are realistic values to cartilage stiffness.

With increasing content of collagen the values of cartilage stiffness rose in the study significantly. It can be derived with the help of already existing literature that an intact superficial collagen layer plays a determining role for the indenter measurement. It was surprising that no significant dependence was ascertained between glycosaminoglycans and the parameters of cartilage stiffness as well as cartilage thickness. Also the influence of the body mass on cartilage thickness is inessential in the healthy knee.

My own practical experiences in joint preparations confirm the literature opinion that the device of the company Artscan medical innovations seems not or only hardly controllable on account of more numerous sources of error for the arthroscopy. On the other hand this measuring system of scientific studies is usable in preparations. Other research and technical developing strategies are necessary for the operative application.

Schrifttum:

1. **Adams, M.E., Matyas, J.R., Huang, D., Dourado, G.S. (1995):** Expression of proteoglycans and collagen in the hypertrophic phase of experimental osteoarthritis. *J. Rheumatol. Suppl.* 43, 94-97
2. **Aigner, T., Söder, S. (2008):** Typing, grading and staging of osteoarthritis: Histopathological assessment of joint degeneration. *Z. Rheumatol.* 67 (1). 32-36, 38-40
3. **Andric-Moser, A. (2008):** In Vitro und In Vivo – Messungen der Knorpelsteifigkeit. Inaugural-Dissertation Medizinischen Fakultät der Universität Ulm
4. **Appleyard, R.C., Swain, M.V., Khanna, S., Murrell, G.A. (2001):** The accuracy and reliability of a novel handheld dynamic indentation probe for analysing articular cartilage. *Phys. Med. Biol.* 46, 541-550
5. **Appleyard, R.C., Burkhardt, D., Ghosh, P., Read, R., Cake, M., Swain, M.V., Murrell, G.A. (2003):** Topographical analysis of the structural, biochemical and dynamic biomechanical properties of cartilage in an ovine model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartil.* 11, 65-77
6. **Athanasίου, K.A., Rosenwasser, M.P., Buckwalter, J.A., Malinin, T.I., Mow, V.C. (1991):** Interspecies comparisons of in situ intrinsic mechanical properties of distal femoral cartilage. *J. Orthop. Res.* 9, 330-340
7. **Bader, D.L., Kempson, G.E. (1994):** The short-term compressive properties of adult human articular cartilage. *Biomed. Mater Eng.* 4(3), 245-256
8. **Baldassari, M., Goodwin, J.S., Farley, M.L., Bierbaum, B.E., Goldring, M.B., Burstein, D., Gray, M.L. (2007):** Relationship between cartilage stiffness and dGEMRIC index: Correlation and Prediction. *J. Orthop. Res.* 25, 904-912

9. **Barthez, P.Y., Bais, R.J., Vernooij, J.C. (2007):** Effect of ultrasound beam angle on equine articular cartilage thickness measurement. *Vet. Radiol. Ultrasound* 48(5), 457-459

10. **Behrens, P. (2004):** Indikations- und Durchführungsempfehlung der Arbeitsgemeinschaft „Gewebereneration und Gewebeersatz der DGU & DGOOC zur autologen Chondrozytentransplantation (ACT). *Z. Orthop.* 142, 529-539

11. **Benninghoff, A. (1925):** Form und Bau der Gelenkknorpel in ihren Beziehungen zur Funktion: II. Aufbau des Gelenkknorpels in seinen Beziehungen zur Funktion. *Z. Zellforsch.* 2, 783 - 863

12. **Brama, P.A., Holopainen, J., van Weeren, P.R., Firth, E.C., Helminen, H.J., Hyttinen, M.M. (2009):** Effect of loading on the organisation of the collagen fibril network in juvenile equine articular cartilage. *J. Orthop. Res.* 27, 1226-1234

13. **Brommer, H., Laasanen, M.S., Brama, P.A., van Weeren, P.R., Helminen, H.J., Jurvelin, J.S. (2005):** Functional consequences of cartilage degeneration in the equine metacarpophalangeal joint: quantitative assessment of cartilage stiffness. *Equine Vet. J.* 37(5), 462-467

14. **Brommer, H., Laasanen, M.S., Brama, P.A., van Weeren, P.R., Helminen, H.J., Jurvelin, J.S. (2006):** In situ and ex vivo evaluation of an arthroscopic indentation instrument to estimate the health status of articular cartilage in the equine metacarpophalangeal joint. *Vet. Surg.* 35, 259-266

15. **Castriota-Scanderbeg, A. (1996):** Ultrasound and skeletal maturation. *Skeletal. Radiol.* 25(2), 142

16. **Collins, D. (1949):** The pathology of articular and spinal diseases. E. Arnold, London

17. **Custers, R.J., Creemers, L.B., Verbout, A.J., van Rijen, M.H., Dhert, W.J., Saris, D.B.(2007):** Reliability, reproducibility and variability of the traditional Histologic/Histochemical Grading System versus the new OARSI Osteoarthritis Cartilage Histopathology Assessment System. *Osteoarthritis Cartil.* 15, 1241-1248
18. **Dämmrich, K., Simesen, M.G., Hänichen, T. (1978):** Hypervitaminosis D in sheep. An experimental study. *Acta. Vet. Scand.* 19(4), 588-600
19. **de Grauw, J.C., van de Lest, C.H., van Weeren, R., Brommer, H., Brama, P.A. (2006):** Arthrogenic lameness of the fetlock: Synovial fluid markers of inflammation and cartilage turnover in relation to clinical joint pain. *Equine Vet. J.* 38(4), 305-311
20. **Deutzmann, R., Bruckner-Tudermann, L., Bruckner, P. (2003):** Binde- und Stützgewebe. In: *Biochemie und Pathobiochemie*, (Hrsg.) Löffler, G., Petrides, P.E., Springer-Verlag, Berlin, 7. Aufl., 754-787
21. **Dietz, O., Rijkenhuizen, A. (1999):** Gonotrochlose: In *Handbuch Pferdepraxis*, (Hrsg.) Dietz, O., Huskamp, B., Enke-Verlag, Stuttgart, 3. Aufl., 886-888
22. **Disler, D.G., Raymond, E., May, D.A., Wayne, J.S., McCauley, T.R. (2000):** Articular Cartilage Defects: In vitro evaluation of accuracy and interobserver reliability for detection and grading with US. *Radiol.* 215, 846-851
23. **Drommer, W. (2006):** Synovia - Untersuchung: In: *Handbuch Pferdepraxis*, (Hrsg.) Dietz, O., Huskamp, B., Enke-Verlag, Stuttgart, 3. Aufl., 6-9
24. **Dyce, K.M., Sack, W.O., Wensing, C.J.G. (1991):** Die Gelenke der Beckengliedmaße: In: *Anatomie der Haustiere: Lehrbuch für Studium und Praxis*, (Hrsg.) Dyce, K.M., Sack, W.O., Wensing, C.J.G. Enke-Verlag, Stuttgart, 1. Aufl., 101-104
25. **Eckstein, F., Müller-Gerbl, M., Putz, R. (1992):** Distribution of subchondral bone density and cartilage thickness in the human patella. *J. Anat.*, 425-433

26. **Eikenberry, E.F., Mendler, M., Bürgin, R., Winterhalter, K.H., Bruckner, P. (1992):** Fibrillar organisation in cartilage. In: Kuettner, K.E., Schleyerbach, R., Peyron, J.G., Hascall (eds). *Artic. Cartil. Osteoarthritis*, Raven Press, New York, 133-149
27. **Engl, J. (2007):** Festigkeit und Dicke des hyalinen Knorpels am equinen Talus. Inaugural-Dissertation der Justus-Liebig-Universität Gießen
28. **Engl, J. (2008):** Spezifisches Verteilungsmuster der Knorpel­elastizität und –dicke am Talus des Pferdes; *Tierärztl. Prax.* 36 G, 104-109
29. **Farndale, R.W., Sayers, C.A., Barrett, A.J. (1982):** A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycosaminoglycans in cartilage cultures. *Connect. Tissue Res.* 9, 247-248
30. **Franz, T., Hasler, E.M., Hagg, R., Weiler, C., Jakob, R.P., Mainil-Varlet, P. (2001):** .In situ compressive stiffness, biochemical composition, structural integrity of articular cartilage of the human knee joint. *Osteoarthritis and Cart.* 9 (6), 582-592
31. **Friesbie, D.D., Cross, M.W., Mellwraith, C.W. (2006):** A comparative study of articular cartilage thickness in the stifle of animal species used in human pre-clinical studies compared to articular cartilage thickness in the human knee. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.* 19, 142-146
32. **Froimson, M.I., Ratcliffe, A., Gardner, T.R., Mow, V.C. (1997):** Differences in patellofemoral joint cartilage material properties and their significance to the etiology of cartilage surface fibrillation. *Osteoarthritis Cart.* 5, 377-386
33. **Hartung, K. (2006):** Röntgenuntersuchung: In : *Handbuch Pferdepraxis*, (Hrsg.) Dietz, O., Huskamp, B., Enke-Verlag, Stuttgart, 3. Aufl., 20-22
34. **Heisel, J., Mittelmeier, H. (1992):** Sixteen-years' experience with ceramic hip prostheses. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 282, 64-72

35. **Herberhold, C., Faber, S., Stammberger, T., Steinlechner, M., Putz, R., Englmeier, K.H., Reiser, M., Eckstein, F. (1999):** In situ measurement of articular cartilage deformation in intact femoropatellar joints under static loading. *J. Biomech.* 32, 1287-1295
36. **Hunziker, E.B., Korhonen, R.K., Wong, M., Arokoski, J., Lindgren, R., Helminen, H.J., Jurvelin, J.S. (1992):** Importance of the superficial tissue layer for the indentation stiffness of articular cartilage. *Med. Eng. Phys.* 24(2), 99-108
37. **Hyttinen, M.M., Holopainen, J., van Weeren, P.R., Firth, E.C., Helminen, H.J., Brama, P.A. (2009):** Changes in collagen fibril network organization and proteoglycan distribution in equine articular cartilage during maturation and growth. *J. Anat. Nov.* 215(5), 584-591
38. **Ionita, J.C., Lempe, A., Leupold, T., Spadavecchia, C. (2007):** Analgetika beim Pferd: eine aktuelle Übersicht; *Pferdeheilk.* 23 (4), 312- 322
39. **Jurvelin, J., Kiviranta, I., Arokoski, J., Tammi, M., Helminen, H.J. (1987):** Indentation study of the biochemical properties of articular cartilage in the canine knee. *Eng. Med.* 16, 15-22
40. **Jurvelin, J.S., Räsänen, T., Kolmonen, P., Lyyra, T. (1995):** Comparison of optical, needle probe and ultrasonic technique for the measurement of articular cartilage thickness. *J. Biomech.*, 28(2), 231-235
41. **Julkunen, P., Korhonen, R.K., Nissi, M.J., Jurvelin, J.S. (2008):** Mechanical characterization of articular cartilage by combining magnetic resonance imaging and finite - element analysis - a potential functional imaging technique. *Phy. Med. Biol.* 53, 2425-2438

42. **Julkunen, P., Harjula, T., Livarinen, J., Marjanen, J., Seppänen, K., Närhi, T., Arokoski, J., Lammi, M.J., Brama, P.A., Jurvelin, J.S., Helminen, H.J. (2009):** Biomechanical, biochemical and structural correlations in immature and mature rabbit articular cartilage. *Osteoarthritis Cartil.* 17, 1628-1638
43. **Kainer, R.A. (1989):** Kniebereich (Regio genus): In: *Adam's Lahmheit bei Pferden*, (Hrsg.) Stashak, T.S., M&H. Schaper, Hannover, 4. Aufl., 56-60
44. **Kauffmann, G., Wunsch, C., Schneider, B. (2001):** Gerätekunde: In: *Radiologie*, (Hrsg.) Kauffmann, G., Moser, E., Sauer, R., Urban & Fischer, München/Jena, 2. Aufl., 86 - 244
45. **Kempson, G.E., Muir, H., Swanson, S.A. (1970):** Correlations between stiffness and the chemical constituents of cartilage on the human femoral head. *Biochem. Biophys. Acta.* 215(1), 70-77
46. **Kiefer, G.N., Sundby, K., McAllister, D., Shrive, N.G., Frank, C.B., Lam, T., Schachar, N.S. (1989):** The effect of cryopreservation on the biomechanical behavior of bovine articular cartilage. *J. of Orthop. Res.* 7, 494-501
47. **Kiviranta, I., Jurvelin, J., Tammi, M., Säämänen, A.M., Helminen, H.J. (1987):** Weight bearing controls glycosaminoglycan concentration and articular cartilage thickness in the knee joints of young beagle dogs. *Arthritis Rheum.* Jul. 30 (7), 801-809
48. **Kiviranta, P., Rieppo, J., Korhonen, J.K., Julkunen, P., Töyräs, J., Jurvelin, J.S. (2006):** Collagen Network Primarily Controls Poisson's Ratio of Bovine Articular Cartilage in Compression. *J. Orthop. Res.* 24(4), 690-699

49. **Knudson, W., Loeser, R.F. (2002):** CD44 and integrin matrix receptors participate in cartilage homeostasis. *Cell Mol. Life Sci.* 59(1), 36-44
50. **Korhonen, R.K., Wong, M., Arokoski, J., Lindgren, R., Helminen, H.J., Hunziker, E.B., Jurvelin, J.S. (2002):** Importance of the superficial tissue layer for the indentation stiffness of articular cartilage, *Med. Eng. Phys.* 24(2), 99-108
51. **Korhonen, R.K., Saarakkala, S., Töyräs, J., Laasanen, M.S., Kiviranta, I., Jurvelin, J.S. (2003):** Experimental and numerical validation for the novel configuration of an arthroscopic indentation instrument. *Phys. Med. Biol.* 48, 1565-1576
52. **Kuettner, K.E., Cole, A.A., Koepf, H., Eger, W., Muehleman, C., Valdellon, A., Buckwalter, J.A. (1999):** Prevalence of articular cartilage degeneration in the ankle and knee joints of human organ donors. *J. Orthop. Sci.* 4(6), 407-412
53. **Kummer, J. (1980):** Vertebrobasilar insufficiency and degenerative changes in the cervical vertebral column. *Med. Clin.* 75(3), 125-126
54. **Kurz, B., Jin, M., Patwari, P., Cheng, D.M., Lark, M.W., Grodzinski, A.J. (2001):** Biosynthetic response and mechanical properties of articular cartilage after injurious compression. *J. Orthop. Res.* 19(6), 1140-1146
55. **Laasanen, M.S., Saarakkala, S., Jurvelin, J.S., Törrönen, K., Lammi, M.J., Lappalainen, R., Töyräs, J. (2003):** Ultrasound indentation of bovine knee articular cartilage in situ. *J. Biomech.* 36, 1259-1267
56. **Lecocq, M., Girard, C.A., Fogarty, U., Beauchamp, G., Richard, H., Lavery, S. (2008):** Cartilage matrix changes in the developing epiphysis: Early events on the pathway to equine Osteochondrosis. *Equine Vet. J.* 40 (5), 442-454

57. **Lee, C.L., Huang, M.H., Chai, C.Y., Chen, C.H., Su, J.Y., Tien, Y.C. (2008):** The validity of in vivo ultrasonographic grading of osteoarthritic femoral condylar cartilage: a comparison with in vitro ultrasonographic and histologic gradings. *Osteoarthritis Cartil.* 16, 352-358
58. **Liebich, H.G., Böck, P., Budras, K.D., Maierl, J., Reese, S. (1990):** Knorpelgewebe: In: Funktionelle Histologie, Farbatlas und Kurzlehrbuch der mikroskopischen Anatomie der Haussäugetiere, (Hrsg.) Liebich, H.G., Schattauer Verlag, Stuttgart – New-York, 62-63
59. **Little, C.B., Ghosh, P., Bellenger, C.R. (1996):** Topographical variation in biglycan and decorin synthesis by articular cartilage in the early stages of osteoarthritis: an experimental study in sheep. *J. Orthop. Res.* 14, 433-444
60. **Litzke, L.-F. (2004):** Erkrankungen der Gelenke: In: Lehrbuch der Allgemeinen Chirurgie für Tiermediziner, (Hrsg.) Dietz, O., Litzke, L.-F. Enke-Verlag, Stuttgart, 6. Aufl., 229-235
61. **Lu, M.H., Zheng, Y.P. (2004):** Indentation test of soft tissues with curved substrates: a finite element study. *Med. Biol. Eng. Comput.* 42(4), 535-540
62. **Lyyra, T. (1997):** Development, validation and clinical application of indentation technique for arthroscopic measurement of cartilage stiffness. Doctoral Dissertation, Kuopio
63. **Lyyra, T., Arokoski, J.P., Oksala, N., Vihko, A., Hyttinen, M., Jurvelin, J.S., Kiviranta, I. (1999):** Experimental validation of arthroscopic cartilage stiffness measurement using enzymatically degraded cartilage samples. *Phys. Med. Biol.* 44, 525-535
64. **Lyyra-Laitinen, T., Niinimäki, M., Töyräs, J., Lindgren, R., Kiviranta, I., Jurvelin, J.S. (1999):** Optimization of the arthroscopic indentation instrument for the measurement of thin cartilage stiffness. *Phys. Med. Biol.* 44, 2511-2524

65. **Lyyra, T., Kiviranta, I., Väättäinen, U., Helminen, H.J., Jurvelin, J.S. (1999):** In vivo characterization of indentation stiffness of articular cartilage in the normal human knee. *J. Biomed. Mater Res.* 48, 482-487
66. **Mankin, H.J., Dorfman, H., Lipiello, L., Zarins, A.(1971):** Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J. Bone Joint Surg.* 53(3), 523-537
67. **Martens, A., Demoor, A. (1999):** Osteochondrosis dissecans im Sprunggelenk: In: *Handbuch Pferdepraxis*, (Hrsg.) Dietz, O., Huskamp, B., Enke-Verlag, Stuttgart, 3. Aufl., 906-908
68. **Martino, F., Ettorre, G.C., Angelelli, G., Macarini, L., Patella, V., Moretti, B., D'Amore, M., Cantatore, F.P. (1993) :** Validity of echographic evaluation of cartilage in gonarthrosis. *Clin. Rheumatol.* 12 (2),178-183
69. **Mathiesen, O., Konradsen, L., Torp-Pedersen, S., Jørgensen, U. (2004):** Ultrasonography and articular cartilage defects in the knee: an in vitro evaluation of the accuracy of cartilage thickness and defect size assessment. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 12(5), 440-443
70. **Mcllwraight, C.W., Nixon, A.J., Wright, I.M., Boening, K.J. (2005):** Diagnostic and surgical arthroscopy of the femoropatellar and femorotibial joints: In: *Diagnostic and Surgical Arthroscopy in the Horse*, (Hrsg.) Mcllwraight, C.W., Mosby Elsevier, 3. Aufl., 197-267
71. **McCune, W.J., Dedrick, D.K., Aisen, A.M., MacGuire, A. (1987):** Sonographic Evaluation of Osteoarthritic Femoral Condylar Cartilage. *Clin. Orthop. Relat. Res.* (254), 230-235

72. **Meachim, G., Bentley, G., Baker, R. (1977):** Effect of age on thickness of adult patellar articular cartilage. *Ann. Rheumat. Dis.* 36, 563-568
73. **Mutschler, W., Kirkpatrick, C.J., Mohr, W., (1984):** Experimental studies on the pathogenesis of chronic arthropathy: The effects of homogentisic acid on adult and fetal articular chondrocyte morphology, proliferative capacity and synthesis of proteoglycans in vitro. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 47(4), 347-360
74. **Naredo, E., Acebes, C., Möller, I., Canillas, F., de Agustín, J.J., de Miguel, E., Filippucci, E., Iagnocco, A., Moragues, C., Tuneu, R., Uson, J., Garrido, J., Delgado-Baeza, E., Sáenz-Navarro, I. (2008):** Ultrasound validity in the measurement of knee cartilage thickness. *Ann. Rheum. Dis.* 68 (8), 1322-1327
75. **Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E. (1992):** Kniegelenk: In: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere; Band 1: Bewegungsapparat*, (Hrsg.) Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E. Verlag Paul Parey, Hamburg, Stuttgart, 6. Aufl., 261-267
76. **Nieminen, M.T., Rieppo, J., Töyräs, J., Hakumäki, J.M., Silvennoinen, J., Hyttinen, M.M., Helminen, H.J., Jurvelin, J.S. (2001):** T2 relaxation reveals spatial collagen architecture in articular cartilage: a comparative quantitative MRI and polarized light microscopic study. *Magn. Reson. Med.* 46(3), 487-493
77. **Nieminen, H.J., Töyräs, J., Rieppo, J., Nieminen, M.T., Hirvonen, J., Korhonen, R., Jurvelin, J.S. (2002):** Real-time ultrasound analysis of articular cartilage degradation in vitro. *Med. & Biol.*, 28(4), 519-525
78. **Nissi, M.J., Rieppo, J., Töyräs, J., Laasanen, M.S., Kiviranta, I., Jurvelin, J.S., Nieminen, M.T. (2006):** T(2) relaxation time mapping reveals age- and species - related diversity of collagen network architecture in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartil.* 14(12),1265-1271

79. **Oakley, S.P., Lassere, M.N., Portek, I., Szomor, Z., Ghosh, P., Kirkham, B.W., Murrell, G.A., Wulf, S., Appleyard, R.C. (2004):** Biomechanical, histologic and macroscopic assessment of articular cartilage in a sheep model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartil.* 12, 667-679
80. **Oakley, S.P., Portek, I., Szomor, Z., Appleyard, R.C., Ghosh, P., Kirkham, B.W., Murrell, G.A., Lassere, M.N. (2005):** Arthroscopy – a potential „gold standard“ for the diagnosis of the chondropathy of early osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartil.* 13(5), 368-378
81. **Olstad, K., Ytrephus, B., Ekman, S., Carlson, C.S., Dolvik, N.I. (2008):** .Epiphyseal cartilage canal blood supply to the distal femur of foals. *Equine Vet. J.* 40, 433-439
82. **Otte, P. (2000):** III. Beanspruchung: In: *Der Arthrose - Prozess Teil 1: Osteochondrale Strukturen*, (Hrsg.) Otte, P., Novartis Pharma Verlag, Nürnberg, 75-114
83. **Pauwels, F. (1959):** New guides for the surgical treatment of osteoarthritis of the hip. *Rev. Chir. Orthop. Reparatrice Appar. Mot.*, 45, 681-702
84. **Poole, C.A., Ayad, S., Schofield, J.R. (1986):** Changes in the collagen and proteoglycan of articular cartilage in arthritis. *Rheumat.* 10, 316-371
85. **Poole, C.A., Ayad, S., Schofield, J.R. (1988):** Chondrons from articular cartilage: Immunolocalization of type V collagen in the pericellular capsule of isolated canine tibial Chondrons. *J. Cell Sci.* 90(4), 635-643
86. **Pritzker, K.P., Gay, S., Jimenez, S.A., Ostergaard, K., Pelletier, J.P., Revell, P.A., Salter, D., van den Berg, W.B. (2006):** Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartil.* 14, 13-29

87. **Prockop, D.J., Inouye, K., Kobayashi, Y., Kyogoku, Y., Kishida, Y., Sakakibara, S. (1982):** Synthesis and physical properties of (hydroxyproline-proline-glycine)₁₀: hydroxyproline in the X-position decreases the melting temperature of the collagen triple helix. *Arch. Biochem. Biophys.* 219(1),198-203
88. **Räsänen, T., Messner, K. (1996):** Regional variations of indentation stiffness and thickness of normal rabbit knee articular cartilage. *J. Biomed. Res.*, 31, 519-524
89. **Rolauffs, B., Margulis, B., Kuettner, K.E., Cole, A.A. (2002):** The cell density of the superficial layer of adult human cartilage is joint specific and is altered by age and degenerative change. *Trans. Orthop. Res. Soc.* 48, 904-913
90. **Rubenstein, J.D., Kim, J.K., Morova-Protzner, I., Stanchev, P.L., Henkelman, R.M. (1993):** Effects of collagen orientation on MR imaging characteristics of bovine articular cartilage. *Radiol.* 188(1), 219-226
91. **Sachs, J.R., Grodzinsky, A.J. (1995):** Electromechanical spectroscopy of cartilage using a surface probe with applied mechanical displacement. *J. Biomech.*, 28(8), 963-976
92. **Schulze, T. (2008):** Der Wert einer „Low-Field“ MRT-Untersuchung für die Diagnose von Knorpeldefekten im Hufgelenk des Pferdes, *Pferdeheilk.* 24, 406-410
93. **Shepherd, D.E., Seedhom, B.B. (1999):** Thickness of human articular cartilage in joints of the lower limb. *Ann. Rheum. Diss.* 58, 27-34
94. **Sousa, T.M. (2008):** Analysis of cartilage wear particles in equine joints and their relationship to several joint diseases. *Pferdeheilk.* 24 (3), 331-336
95. **Stegemann, H., Stalder, K. (1967):** Determination of Hydroxyproline. *Clin. Chim. acta*, 18, 267-273

96. **Swann, A.C., Seedhom, B.B. (1993):** The stiffness of normal articular cartilage and the predominant acting stress levels: implications for the aetiology of osteoarthritis. *J. Rheumatol.* 32, 16-25
97. **Temple-Wong, M.M., Bae, W.C., Chen, M.Q., Bugbee, W.D., Amiel, D., Coutts, R.D., Lotz, M., Sah, R.L. (2009):** Biomechanical, structural and biomechanical indices of degenerative and osteoarthritic deterioration of adult human articular cartilage of the femoral condyle. *Osteoarthritis Cartil.* 17, 1469-1476
98. **Terukina M., Fujioka H., Yoshiya S., Kurosaka M., Makino T., Matsui N., Tanaka J. (2003):** Analysis of the thickness and curvature of articular cartilage of the femoral condyle. *Arthrosc.* 19(9), 969-973
99. **Tomlinson, J.E., Redding, W.R., Sage, A. (2000):** Ultrasonographic evaluation of tarsocrural joint cartilage in normal adult horses. *Vet. Radio. & Ultra.* 41(5), 457-460
100. **Töyräs, J., Rieppo, J., Nieminen, M.T., Helminen, H.J., Jurvelin, J.S. (1999):** Characterization of enzymatically induced degradation of articular cartilage using high frequency ultrasound. *Phys. Med. Biol.* 44, 2723-2733
101. **Töyräs, J., Lyyra-Laitinen, T., Niinimäki, M., Lindgren, R., Nieminen, M.T., Kiviranta, I., Jurvelin, J.S. (2000):** Estimation of the young's modulus of articular cartilage using an arthroscopic indentation instrument and ultrasonic measurement of tissue thickness. *J. Bio.* 34, 251-256
102. **Töyräs, J., Korhonen, R.K., Voutilainen, T., Jurvelin, J.S., Lappalainen, R. (2005):** Improvement of arthroscopic cartilage stiffness probe using amorphous diamond coating. *J. Biomed. Mater Res. Part B: Appl. Biomater.* 73B, 15-22

103. **Vyhmeister, C. (2002):** Computertomographische Arthrographie des Knorpels und von Knorpelläsionen im Fesselgelenk des Pferdes. Inaugural - Dissertation der Tierärztlichen Hochschule Hannover
104. **Wheaton, A.J., Borthakur, A., Shapiro, E.M., Regatte, R.R., Akella, S.V., Kneeland, J.B., Reddy, R. (2004):** Proteoglycan loss in human knee cartilage: quantitation with sodium MR imaging - feasibility study. *Radiol.* 231(3), 900-905
105. **Wissdorf, H., Hertsch, H., Keller, H., Stadtbäumer, G. (2002):** Kniebereich mit Kniescheiben- und Kniekehlbereich: In: Praxisorientierte Anatomie und Propädeutik des Pferdes, (Hrsg.) Wissdorf, H., Gerhards, H., Huskamp, B., Deegen, E., Verlag M.&H. Schaper Alfeld - Hannover, 2. Aufl., 563-580
106. **Yao, J.Q., Seedhom, B.B. (1999):** Ultrasonic measurement of the thickness of human articular cartilage in situ. *Rheumat.*, 38(12), 1269-1271

VIII. Tabellarische Darstellung der Messdaten:

Pferd	Zelle	Seite	Reihe	Stelle	KS1	KS2	KS3	KS4	MMWKS	KD1	KD2	KD3	MMW KD	Kollagen µg/mg	PG 1:64 µg/mg	PG
Pferd	Zelle	Seite	Reihe	Stelle	KS1	KS2	KS3	KS4	mKS	KD1	KD2	KD3	mKD	Koll	PG	PG
	8	2	1	1 A	0,81	0,85	0,85	0,85	0,73	0,81	0,7	0,8	0,9	0,8	7,70566214	14,3453042
	8	2	1	1 B	0,33	0,36	0,36	0,36	0,32	0,3425	2,5	2,6	2,6	2,566666667	7,70566214	14,3453042
	8	2	1	1 C	0,27	0,26	0,24	0,25	0,25	0,255	2,3	2,4	2,5	2,4	13,353471	16,16667429
	8	2	1	1 D	0,24	0,23	0,23	0,23	0,2475	2,1	2	2,2	2,2	1,633333333	13,353471	16,16667429
	8	2	1	1 E	0,4	0,39	0,46	0,52	0,4425	1,6	1,7	1,6	1,6	4,15951627	10,7692	10,7692
	8	2	1	1 F	0,7	0,62	0,6	0,57	0,6225	1,3	1,2	1,2	1,4	1,3	4,15951627	10,7692
	8	2	1	1 G	0,9	0,7	0,7	0,6	0,7675	0,6	0,7	0,6	0,5	0,6	10,8110142	9,883556332
	8	2	1	2 A	0,81	0,81	0,82	0,94	0,93	0,85	1,2	0,9	1	1,8	10,8110142	9,883556332
	8	2	1	2 B	0,37	0,33	0,33	0,33	0,26	0,3225	1,8	1,9	1,7	1,8	16,6222393	13,06927059
	8	2	1	2 C	0,27	0,3	0,3	0,3	0,32	0,2975	1,9	1,9	1,9	1,9	17,5221953	7,13704186
	8	2	1	2 D	0,21	0,21	0,24	0,23	0,2225	1,8	1,9	1,9	1,9	1,866666667	16,6222393	13,06927059
	8	2	1	2 E	0,56	0,59	0,54	0,54	0,55	0,56	1,3	1,2	1,4	1,3	17,5221953	7,13704186
	8	2	1	2 F	0,45	0,51	0,41	0,41	0,32	0,4225	1,2	1,1	1	1,1	18,4809568	19,83099661
	8	2	1	2 G	0,48	0,45	0,62	0,62	0,54	0,5225	0,6	0,5	0,5	0,5	2,133333333	19,83099661
	8	2	1	3 A	0,71	0,68	0,68	0,54	0,6525	1,3	1,1	1,2	1,2	1,866666667	18,4809568	19,83099661
	8	2	1	3 B	0,48	0,48	0,58	0,52	0,515	1,8	1,9	1,9	1,9	2,133333333	18,4809568	19,83099661
	8	2	1	3 C	0,44	0,34	0,38	0,39	0,34	0,375	2,3	2	2,1	2,1	6,4829404	21,77652503
	8	2	1	3 D	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10,7854124	10,1745824
	8	2	1	3 E	0,34	0,28	0,32	0,32	0,31	0,3125	2,5	2,7	2,6	2,6	5,48523699	17,4823742
	8	2	1	3 F	0,3	0,31	0,32	0,28	0,28	0,3025	2,3	2,2	2,4	2,3	9,54940964	10,88290674
	8	2	1	3 G	0,34	0,32	0,37	0,34	0,3425	2,1	2,1	2,2	2,2	2,033333333	6,85120409	23,99495336
	8	2	1	4 A	0,78	0,81	1,08	1,17	0,96	0,96	0,9	0,7	0,8	0,8	15,1356049	19,95598259
	8	2	1	4 B	0,53	0,52	0,54	0,52	0,5275	0,8	0,9	0,9	0,9	0,866666667	11,1649886	12,20295724
	8	2	1	4 C	0,52	0,43	0,39	0,39	0,39	0,4325	2,6	2,6	2,9	2,7	8,91526917	13,76013913
	8	2	1	4 D	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	33,7710893	7,678588235
	8	2	1	4 E	0,26	0,28	0,27	0,27	0,22	0,2575	2,6	2,5	2,5	2,5	0,966666667	10,88290674
	8	2	1	4 F	0,31	0,25	0,34	0,35	0,35	0,3125	2,3	2,4	2,5	2,4	2,566666667	2,566666667
	8	2	1	4 G	0,38	0,36	0,36	0,3	0,36	0,35	2,3	2,1	2,2	2,2	1,766666667	6,85120409
	8	2	2	1 A	0,5	0,53	0,62	0,61	0,61	0,565	1	1	0,9	0,9	15,1356049	19,95598259
	8	2	2	1 B	0,47	0,46	0,46	0,44	0,39	0,44	2,5	2,6	2,6	2,6	11,1649886	12,20295724
	8	2	2	1 C	0,23	0,21	0,28	0,28	0,25	0,2425	2,4	2,3	2,3	2,3	8,91526917	13,76013913
	8	2	2	1 D	0,27	0,25	0,31	0,28	0,2775	1,7	1,7	1,7	1,9	1,633333333	33,7710893	7,678588235
	8	2	2	1 E	0,49	0,45	0,45	0,56	0,52	0,505	1,6	1,6	1,7	1,7	1,3	0,5
	8	2	2	1 F	0,5	0,58	0,58	0,58	0,52	0,545	1,3	1,3	1,4	1,4	0,966666667	10,88290674
	8	2	2	1 G	0,47	0,48	0,48	0,42	0,39	0,44	0,4	0,4	0,6	0,6	1,566666667	11,1649886
	8	2	2	2 A	0,55	0,47	0,41	0,41	0,42	0,4625	0,6	0,6	0,7	0,7	1,433333333	8,91526917
	8	2	2	2 B	0,37	0,42	0,39	0,39	0,31	0,3725	1,5	1,5	1,7	1,7	1,333333333	33,7710893
	8	2	2	2 C	0,35	0,33	0,34	0,34	0,3	0,33	1,9	1,9	1,9	1,9	1,3	0,5
	8	2	2	2 D	0,26	0,25	0,2	0,2	0,21	0,23	1,3	1,4	1,6	1,6	0,966666667	10,88290674
	8	2	2	2 E	0,39	0,37	0,39	0,39	0,41	0,39	1,2	1,4	1,4	1,4	1,433333333	8,91526917
	8	2	2	2 F	0,56	0,53	0,43	0,43	0,41	0,4975	1,2	1,3	1,4	1,4	1,333333333	33,7710893
	8	2	2	2 G	0,64	0,53	0,49	0,49	0,41	0,5025	0,5	0,5	0,5	0,5	1,3	0,5
	8	2	2	3 A	0,57	0,55	0,66	0,66	0,67	0,6125	0,9	0,9	1,1	1,1	0,966666667	10,88290674

8	2	3 B	0.58	0.52	0.63	0.54	0.5675	1.1	1.1	1.1	1.1	5,57048906	30,14125714
8	2	3 C	0.38	0.36	0.35	0.36	0.3625	1.5	1.4	1.3	1.4		
8	2	3 D	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
8	2	3 E	0.3	0.32	0.27	0.27	0.29	2.1	2.3	2.3	2.3	8,53677436	21,47896037
8	2	3 F	0.27	0.26	0.25	0.26	0.26	3.5	3.2	3.4	3.4		
8	2	3 G	0.39	0.37	0.48	0.33	0.3925	1.9	1.9	1.7	1.7		
8	2	4 A	0.48	0.46	0.6	0.54	0.525	0.8	0.6	0.7	0.7		
8	2	4 B	0.5	0.53	0.62	0.54	0.5475	0.9	0.9	1	1	10,4289545	32,7896635
8	2	4 C	0.26	0.22	0.3	0.26	0.26	2	2	2	2		
8	2	4 D	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
8	2	4 E	0.1	0.1	0.13	0.14	0.1175	2.1	2.1	2.1	2.3	2,166666667	
8	2	4 F	0.24	0.26	0.39	0.39	0.32	2.5	2.5	2.6	2.6	10,4758325	18,5823694
8	2	4 G	0.4	0.41	0.45	0.37	0.4075	1.4	1.5	1.3	1.4		
10	2	1 A	1.2	1.11	1.31	0.87	1.1225	0.7	0.7	0.6	0.6	0,666666667	
10	2	1 B	0.56	0.53	0.48	0.52	0.5225	1.6	1.6	1.8	1.8	10,251864	38,24100983
10	2	1 C	0.42	0.46	0.45	0.46	0.4475	2.1	1.9	1.9	1.9	1,966666667	
10	2	1 D	0.42	0.38	0.44	0.44	0.42	2.1	2.1	2.2	2.2	6,85742868	19,34305276
10	2	1 E	0.52	0.52	0.63	0.56	0.5575	1.4	1.3	1.2	1.3	8,80152189	17,51320684
10	2	1 F	0.72	0.65	0.57	0.69	0.6575	1	1.1	0.9	1		
10	2	1 G	0.52	0.49	0.67	0.57	0.5625	0.9	0.6	0.7	0.7	0,733333333	
10	2	1 A	0.68	0.46	0.48	0.52	0.535	0.9	0.9	0.9	0.9		
10	2	1 B	0.46	0.4	0.54	0.53	0.4825	1.9	1.9	1.8	1.8	1,866666667	29,63355864
10	2	1 C	0.38	0.4	0.42	0.39	0.3975	2.2	2.1	1.9	1.9	2,066666667	
10	2	1 D	0.31	0.29	0.34	0.33	0.3175	2.2	2.2	2.4	2.4	2,266666667	27,48499348
10	2	1 E	0.51	0.58	0.62	0.57	0.57	1.7	1.5	1.6	1.6		
10	2	1 F	0.69	0.59	0.59	0.57	0.61	1.8	1.8	1.8	1.8	13,6722143	27,02819742
10	2	1 G	0.5	0.44	0.44	0.41	0.4475	1.5	1.5	1.3	1.3	1,433333333	
10	2	3 A	0.61	0.59	0.67	0.58	0.6125	1	1.1	1.2	1.1		
10	2	3 B	0.63	0.56	0.52	0.51	0.555	1.2	1.5	1.3	1.3	1,333333333	33,94462732
10	2	3 C	0.36	0.31	0.33	0.35	0.3375	2.4	2.4	2.4	2.4		
10	2	3 D	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
10	2	3 E	0.38	0.35	0.46	0.35	0.385	3.7	3.3	3.4	3.4	3,466666667	
10	2	3 F	0.31	0.32	0.33	0.32	0.32	2.2	2.2	2.2	2.2	5,61087848	31,02368934
10	2	3 G	0.58	0.53	0.64	0.55	0.575	1	1.1	1.1	1.1	1,066666667	
10	2	4 A	0.51	0.46	0.46	0.43	0.465	1	1	0.9	0.9	0,966666667	
10	2	4 B	0.6	0.54	0.5	0.55	0.5475	1.2	1.2	1.2	1.2	9,04360642	32,26976095
10	2	4 C	0.58	0.5	0.3	0.3	0.42	2.7	2.5	3	3	2,733333333	
10	2	4 D	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
10	2	4 E	0.42	0.41	0.39	0.35	0.3925	3	3.4	3.1	3.1	3,166666667	
10	2	4 F	0.37	0.44	0.37	0.39	0.3925	1.9	2.2	2.2	2.1	7,78608382	47,08317075
10	2	4 G	0.46	0.46	0.53	0.47	0.48	1.2	1.2	1.2	1.2		
10	2	1 A	0.81	0.79	0.83	1.15	0.895	0.4	0.4	0.4	0.4	23,897391	38,63125833
10	2	1 B	0.6	0.57	0.53	0.48	0.545	1.2	1.2	1.2	1.2		
10	2	1 C	0.47	0.42	0.42	0.42	0.4325	2	2	2	2		
10	2	1 D	0.46	0.44	0.32	0.32	0.385	1.6	1.4	1.4	1.4	18,8711997	31,9620586
10	2	1 E	0.62	0.62	0.69	0.51	0.61	1.2	1.2	1.2	1.2		
10	2	1 F	0.74	0.6	0.63	0.52	0.6225	1	1	0.8	0.8	18,6327245	24,5200128
10	2	1 G	0.7	0.62	0.84	0.74	0.725	0.4	0.4	0.4	0.4		

10	2	2 A	0.97	1.16	0.93	0.99	1,0125	0.6	0.6	0.6	10,8734936	32,16259886
10	2	2 B	0.43	0.32	0.65	0.43	0,4575	1.8	1.8	1.8		
10	2	2 C	0.44	0.38	0.37	0.36	0,3875	2	2.2	2.4	9,7386206	35,89182086
10	2	2 D	0.32	0.36	0.33	0.26	0,3175	1.6	1.6	1.6	11,2771951	23,80912162
10	2	2 E	0.64	0.58	0.66	0.63	0,6275	1.8	1.8	1.8		
10	2	2 F	0.52	0.49	0.57	0.46	0,51	1.4	1.4	1.4	15,5673882	40,76328752
10	2	2 G	0.69	0.67	0.68	0.66	0,675	0.9	0.7	0.8		
10	2	3 A	0.67	0.61	0.56	0.61	0,6125	1.2	1	0.8		
10	2	3 B	0.48	0.43	0.49	0.48	0,47	1	1.2	1.4		
10	2	3 C	0.35	0.27	0.44	0.38	0,36	2.4	2.4	2.2	2,333333333	
10	2	3 D	*	*	*	*	*	*	*	*		
10	2	3 E	0.33	0.27	0.33	0.27	0,3	3.4	3.6	3.6	3,533333333	
10	2	3 F	0.44	0.39	0.4	0.46	0,4225	1.8	1.8	1.8	12,0069724	35,18533094
10	2	3 G	0.65	0.54	0.5	0.37	0,515	1	1	0.8	0,933333333	
10	2	4 A	0.41	0.4	0.53	0.6	0,485	1.2	1.2	0.8	1,066666667	
10	2	4 B	0.53	0.45	0.56	0.51	0,5125	1.2	1.2	1.2	13,7413298	39,21389353
10	2	4 C	0.31	0.26	0.32	0.27	0,29	2.8	2.8	2.6	2,733333333	
10	2	4 D	*	*	*	*	*	*	*	*		
10	2	4 E	0.28	0.3	0.28	0.25	0,2775	3	3	2.8	2,933333333	
10	2	4 F	0.5	0.43	0.48	0.41	0,455	2	2	2.2	2,066666667	39,77314392
10	2	4 G	0.4	0.46	0.53	0.52	0,4775	1	1	1		
15	2	1 A	1.26	1.06	0.92	0.84	1,02	0.7	0.8	0.8	0,766666667	
15	2	1 B	0.55	0.51	0.5	0.55	0,5275	1.8	1.8	1.6	1,733333333	33,75353287
15	2	1 C	0.35	0.34	0.39	0.36	0,36	2.3	2.3	2.2	2,266666667	
15	2	1 D	0.3	0.27	0.42	0.34	0,3325	2	2.3	2.4	2,233333333	41,76993419
15	2	1 E	0.6	0.56	0.63	0.53	0,58	1.3	1.3	1.4	1,333333333	
15	2	1 F	0.7	0.65	0.62	0.65	0,655	1.2	1.3	1.4	3,19636383	36,3672486
15	2	1 G	0.8	0.85	0.66	0.62	0,7325	0.8	0.5	0.6	0,633333333	
15	2	2 A	0.79	0.73	0.72	0.67	0,7275	0.3	0.6	0.7	0,533333333	
15	2	2 B	0.66	0.55	0.47	0.49	0,5425	1.4	1.4	1.3	1,366666667	28,1469314
15	2	2 C	0.41	0.37	0.4	0.42	0,4	2	2.1	2.1	2,066666667	6,97493258
15	2	2 D	0.38	0.51	0.3	0.21	0,35	2	2	2.2	7,17954303	29,2287089
15	2	2 E	0.48	0.48	0.5	0.56	0,505	1.4	1.5	1.6	13,5307084	34,40691123
15	2	2 F	0.76	0.61	0.61	0.65	0,6575	1.5	1.4	1.4		
15	2	2 G	0.73	0.78	0.52	0.53	0,64	0.4	0.4	0.5	1,433333333	
15	2	3 A	0.44	0.37	0.53	0.47	0,4525	1	1.2	1.1	0,433333333	
15	2	3 B	0.35	0.37	0.38	0.35	0,3625	1.4	1.4	1.6	1,466666667	47,00018191
15	2	3 C	0.3	0.31	0.31	0.29	0,3025	2.1	1.9	2.3	6,7716772	
15	2	3 D	*	*	*	*	*	*	*	*		
15	2	3 E	0.26	0.23	0.3	0.31	0,275	3	3	3.2	3,066666667	
15	2	3 F	0.52	0.51	0.57	0.56	0,54	1.1	1.4	1.4	4,09868649	44,64436218
15	2	3 G	0.48	0.51	0.48	0.46	0,4825	1.4	1.3	1.3	1,333333333	
15	2	4 A	0.55	0.5	0.48	0.48	0,5025	1.2	1.2	1.3	1,233333333	
15	2	4 B	0.41	0.42	0.43	0.37	0,4075	1.6	1.6	1.6	10,7586943	40,2964823
15	2	4 C	0.22	0.23	0.26	0.23	0,235	2.8	3.1	3.2	3,033333333	
15	2	4 D	*	*	*	*	*	*	*	*		
15	2	4 E	0.2	0.22	0.26	0.23	0,2275	2.7	2.7	2.8	2,733333333	
15	2	4 F	0.37	0.35	0.3	0.29	0,3275	2.2	2.5	2.1	2,266666667	40,8956235
15	2	4 G	0.49	0.45	0.51	0.48	0,4825	0.7	0.6	0.5		152

15	2	1 A	0.53	0.54	0.74	0.57	0.595	0.5	0.6	0.8	0.6333333333	9,4863141	31,81993009	
15	2	1 B	0.38	0.36	0.35	0.31	0.35	2.3	2.3	2.5	2,3666666667	8,65292593	23,36433981	
15	2	1 C	0.33	0.35	0.34	0.36	0.345	2.5	2.4	2.2	1,5666666667	10,3615484	32,97680814	
15	2	1 D	0.3	0.35	0.32	0.25	0.305	1.6	1.6	1.5	1,4	12,4799851	29,09355783	
15	2	1 E	0.42	0.43	0.46	0.46	0.4425	1.4	1.3	1.5	1,8	14,0588866	29,19014099	
15	2	1 F	0.5	0.5	0.53	0.42	0.4875	1.3	1.3	1.3	1,3	9,86951016	26,30349604	
15	2	1 G	0.56	0.54	0.52	0.4	0.505	0.7	0.7	0.7	0,7	7,22555292	34,60193087	
15	2	2 A	0.74	0.72	0.72	0.84	0.755	0.6	0.6	0.6	0,6	11,7425863	35,4582863	
15	2	2 B	0.39	0.35	0.32	0.36	0.355	1.8	1.8	1.9	1,8333333333	9,143302	31,03712465	
15	2	2 C	0.43	0.37	0.41	0.38	0.3975	1.9	2.1	2.1	2,0333333333	10,4253682	17,237814	
15	2	2 D	0.38	0.29	0.37	0.35	0.3475	1.9	1.7	1.8	1,8	11,240875	26,86850065	
15	2	2 E	0.49	0.41	0.4	0.4	0.425	1.7	1.7	1.6	1,7	4,6337125	46,23225009	
15	2	2 F	0.4	0.49	0.46	0.37	0.43	1.7	1.7	1.9	1,7666666667	9,11235973	43,041024	
15	2	2 G	0.7	0.59	0.76	0.76	0.7025	0.7	0.8	0.6	0,7	5,29718026	19,4835911	
15	2	3 A	0.39	0.42	0.57	0.46	0.46	0.8	0.8	0.9	0,8	5,26363132	27,1758141	
15	2	3 B	0.3	0.32	0.34	0.33	0.3225	1.1	1.1	1.4	1,2	9,11783278	20,44621913	
15	2	3 C	0.37	0.4	0.4	0.46	0.4075	1.9	1.9	2.1	1,9666666667	6,28192449	28,18574841	
15	2	3 D	*	*	*	*	*	*	*	*	*	5,02971829	39,36298905	
15	2	3 E	0.28	0.33	0.4	0.28	0.3225	2.8	2.8	3.2	2,9333333333	11,7425863	35,4582863	
15	2	3 F	0.25	0.19	0.27	0.29	0.25	1.3	1.4	1.1	1,2666666667	9,143302	31,03712465	
15	2	3 G	0.25	0.39	0.43	0.37	0.3975	1.1	1.1	0.9	1,0333333333	10,4253682	17,237814	
15	2	4 A	0.5	0.59	0.55	0.48	0.53	0.8	0.6	0.7	0,7	11,240875	26,86850065	
15	2	4 B	0.48	0.47	0.42	0.4	0.4425	1.1	0.8	0.9	0,9333333333	4,6337125	46,23225009	
15	2	4 C	0.2	0.17	0.18	0.17	0.18	2.3	2.5	2.5	2,4333333333	9,11235973	43,041024	
15	2	4 D	*	*	*	*	*	*	*	*	*	5,29718026	19,4835911	
15	2	4 E	0.21	0.18	0.26	0.24	0.2225	3.5	3.5	3.2	3,4	5,26363132	27,1758141	
15	2	4 F	0.31	0.37	0.35	0.26	0.3225	2.4	2.2	2.3	2,3	9,11783278	20,44621913	
15	2	4 G	0.36	0.32	0.36	0.33	0.3425	1.4	1.7	1.6	1,5666666667	6,28192449	28,18574841	
17	2	1 A	0.79	1.2	0.71	0.8	0.875	1	1.1	0.9	1	5,02971829	39,36298905	
17	2	1 B	0.6	0.65	0.67	0.72	0.66	1.2	1.2	1.4	1	11,7425863	35,4582863	
17	2	1 C	0.42	0.46	0.6	0.53	0.5025	1.5	1.4	1.2	1,2666666667	9,143302	31,03712465	
17	2	1 D	0.37	0.35	0.37	0.32	0.3525	1.5	1.5	1.5	1,3666666667	10,4253682	17,237814	
17	2	1 E	1.06	0.86	0.8	0.74	0.865	1.5	1.4	1.4	1,4333333333	11,240875	26,86850065	
17	2	1 F	0.67	0.63	0.99	0.64	0.7325	1	1.1	1.2	1,1	4,6337125	46,23225009	
17	2	1 G	0.46	0.53	0.55	0.57	0.5275	0.9	0.9	0.9	0,9	9,11235973	43,041024	
17	2	2 A	0.63	0.62	0.64	0.57	0.615	0.9	0.9	0.8	0,8666666667	5,29718026	19,4835911	
17	2	2 B	0.6	0.48	0.5	0.44	0.505	1.6	1.6	1.7	1,6333333333	5,26363132	27,1758141	
17	2	2 C	0.51	0.51	0.6	0.64	0.565	2.2	2.2	2.1	2,1666666667	9,11783278	20,44621913	
17	2	2 D	0.21	0.19	0.16	0.16	0.18	2.4	2.5	2.5	2,0333333333	6,28192449	28,18574841	
17	2	2 E	0.49	0.52	0.51	0.5	0.505	1.9	2.1	2.1	1,9333333333	5,02971829	39,36298905	
17	2	2 F	0.46	0.54	0.46	0.37	0.4575	2	1.9	1.9	1,7	1,0666666667	11,7425863	35,4582863
17	2	2 G	0.51	0.46	0.49	0.45	0.4775	1.8	1.7	1.6	1,7	5,29718026	19,4835911	
17	2	3 A	0.82	0.9	1.06	1.16	0.985	0.9	0.9	0.9	0,9	5,26363132	27,1758141	
17	2	3 B	0.61	0.68	0.72	0.77	0.695	1	1	1.2	1,0666666667	9,11783278	20,44621913	
17	2	3 C	0.47	0.44	0.4	0.37	0.42	1.9	1.8	1.7	1,8	6,28192449	28,18574841	
17	2	3 D	*	*	*	*	*	*	*	*	*	5,02971829	39,36298905	
17	2	3 E	0.52	0.38	0.41	0.38	0.4225	2.1	2.1	2.1	2,1	11,7425863	35,4582863	
17	2	3 F	0.55	0.59	0.5	0.55	0.5475	1.2	1.2	1.4	1,2666666667	10,4253682	17,237814	
17	2	3 G	0.59	0.5	0.55	0.61	0.5625	1.4	1.3	1.3	1,35	11,240875	26,86850065	
17	2	4 A	0.56	0.52	0.72	0.87	0.6675	0.9	0.9	1	0,9333333333	9,11235973	43,041024	

17	2	1	4 B	0.74	0.53	0.63	0.79	0.6725	1	1	1,2	1,066666667	9,38209508	59,16968659
17	2	1	4 C	0.28	0.24	0.34	0.42	0.32	2,4	2,2	2,1	2,233333333		
17	2	1	4 D											
17	2	1	4 E	0.17	0.23	0.28	0.24	0.23	2,5	2,7	2,7	2,633333333		
17	2	1	4 F	0.37	0.41	0.34	0.35	0,3675	2,1	2,1	2,2	2,133333333	5,77508746	32,66857327
17	2	1	4 G	0.52	0.43	0.52	0.49	0,49	1,5	1,5	1,3	1,433333333		
17	2	2	1 A	0.7	0.75	1	1,2	0,9125	0,9	0,9	1	0,933333333		
17	2	2	1 B	0.48	0.56	0.6	0.52	0,615	1,4	1,6	1,4	1,466666667	18,6893383	23,36999146
17	2	2	1 C	0.55	0.66	0.66	0.56	0,605	2,4	2,1	2,1	2,2		
17	2	2	1 D	0.31	0.32	0.48	0.35	0,365	1,6	1,6	1,6	1,6	17,4393017	44,40740571
17	2	2	1 E	0.66	0.83	0.9	0.76	0,7875	1,4	1,4	1,6	1,6		
17	2	2	1 F	0.62	0.6	0.67	0.44	0,5825	1,1	1	0,9	1	10,0870065	25,99793396
17	2	2	1 G	0.68	0.66	0.62	0.53	0,6225	0,9	0,9	0,9	0,9		
17	2	2	2 A	0.71	0.73	0.53	0.53	0,625	0,7	0,8	0,9	0,8		
17	2	2	2 B	0.41	0.4	0.52	0.57	0,475	2,3	2,4	2,1	2,266666667	19,9668758	22,64774006
17	2	2	2 C	0.45	0.39	0.5	0.48	0,455	2,8	2,8	2,6	2,733333333		
17	2	2	2 D	0.2	0.31	0.19	0.23	0,2325	2,3	2,3	2,4	2,333333333	10,900742	35,1355298
17	2	2	2 E	0.58	0.66	0.52	0.51	0,5675	1,9	1,8	1,8	1,833333333	17,487261	24,45336854
17	2	2	2 F	0.64	0.63	0.43	0.42	0,53	1,4	1,4	1,7	1,5		
17	2	2	2 G	0.78	1.08	0.81	0.76	0,8575	0,7	0,7	0,7	0,7		
17	2	2	3 A	0.68	0.82	0.43	0.45	0,595	0,9	0,9	1	0,933333333		
17	2	2	3 B	0.5	0.57	0.61	0.43	0,5275	1,2	1,1	0,9	1,066666667	13,7440691	31,16578517
17	2	2	3 C	0.51	0.42	0.34	0.35	0,405	2,1	1,8	1,8	1,9		
17	2	2	3 D											
17	2	2	3 E	0.28	0.22	0.23	0.34	0,2675	2,4	2,4	2,4	2,4		
17	2	2	3 F	0.53	0.5	0.54	0.51	0,52	2,1	1,9	1,9	1,966666667	13,3612779	34,2777635
17	2	2	3 G	0.45	0.51	0.5	0.71	0,5425	1,4	1,4	1,4	1,4		
17	2	2	4 A	0.72	0.65	0.63	0.57	0,6425	1,1	1,2	1,2	1,166666667		
17	2	2	4 B	0.39	0.39	0.37	0.55	0,475	1,4	1,4	1,2	1,333333333	12,9085192	30,08324213
17	2	2	4 C	0.31	0.37	0.33	0.24	0,3125	1,6	1,6	1,8	1,666666667		
17	2	2	4 D											
17	2	2	4 E	0.12	0.12	0.19	0.1	0,1325	2,8	2,8	3	2,866666667		
17	2	2	4 F	0.43	0.38	0.47	0.34	0,405	2,4	2,6	2,6	2,533333333	15,5350629	26,6417537
17	2	2	4 G	0.56	0.4	0.49	0.47	0,48	1,7	1,7	1,7	1,7		
18	2	1	1 A	1.6	1.4	1.4	0.75	1,1025	0,9	0,8	0,6	0,766666667		
18	2	1	1 B	0.54	0.63	0.71	0.69	0,6425	1,9	2	2,2	2,033333333	7,90816503	39,84025777
18	2	1	1 C	0.64	0.82	0.41	0.49	0,59	2,2	2,2	2,1	2,166666667		
18	2	1	1 D	0.36	0.34	0.35	0.35	0,35	1,7	1,4	1,6	1,566666667	5,1862607	25,2430727
18	2	1	1 E	0.9	0.83	0.75	0.69	0,7925	1,2	1,4	1,4	1,333333333		
18	2	1	1 F	0.65	0.52	0.59	0.56	0,58	1,2	1,1	1,1	1,133333333	9,42272602	15,35661205
18	2	1	1 G	0.88	0.86	0.69	0.67	0,775	0,7	0,8	0,9	0,8		
18	2	1	2 A	0.59	0.63	0.57	0.6	0,5975	0,7	0,7	1	0,8		
18	2	1	2 B	0.6	0.58	0.74	0.73	0,6625	2,2	2	2	2,066666667	9,71873384	23,10641644
18	2	1	2 C	0.47	0.44	0.53	0.49	0,4825	2,2	2,2	2	2,133333333		
18	2	1	2 D	0.2	0.26	0.29	0.31	0,265	2,2	2,2	2,2	2,3	7,29314303	23,48378537
18	2	1	2 E	0.51	0.43	0.49	0.55	0,495	1,9	1,8	1,7	1,8		
18	2	1	2 F	0.7	0.55	0.56	0.59	0,6	1,7	1,5	1,5	1,566666667	12,3657227	18,898848
18	2	1	2 G	0.53	0.51	0.6	0.59	0,5575	0,8	0,8	0,9	0,833333333		
18	2	1	3 A	0.85	0.85	0.82	0.95	0,8975	0,9	0,9	1	0,933333333		
18	2	1	3 B	0.73	0.68	0.79	0.65	0,7125	1,1	1,1	1,2	1,133333333	9,29632725	32,27858247
18	2	1	3 C	0.44	0.32	0.46	0.41	0,4075	1,7	1,7	1,9	1,766666667		

18	2	1	3 D	*	0.36	0.27	0.315	2.5	2.5	2.7	2,566666667	10,4536906	30,60361768
18	2	1	3 E	*	0.33	0.42	0.41	1.6	1.5	1.7	1,6		
18	2	1	3 F	*	0.34	0.53	0.49	1.6	1.6	1.5	1,566666667		
18	2	1	3 G	*	0.53	0.43	0.49	1.1	1.1	1.1	1,066666667		
18	2	1	4 A	*	0.62	0.51	0.77	1.1	1.1	0.9	0,966666667	6,69188989	17,67663447
18	2	1	4 B	*	0.66	0.64	0.52	1	1	1,8	2		
18	2	1	4 C	*	0.44	0.49	0.44	2.1	2.1	1,8	2		
18	2	1	4 D	*									
18	2	1	4 E	*	0.2	0.31	0.225	2.4	2.6	2.5	2,5	8,7585155	53,57079
18	2	1	4 F	*	0.28	0.35	0.3475	2	2.1	1.9	2		
18	2	1	4 G	*	0.62	0.66	0.615	1.4	1.7	0.9	1,533333333		
18	2	1	1 A	*	0.83	0.78	0.7575	0.6	0.7	0.9	0,8		
18	2	2	1 B	*	0.52	0.53	0.4825	1.9	1.8	2.1	1,933333333	8,28919923	39,11732459
18	2	2	1 C	*	0.3	0.34	0.3275	2.4	2.8	2.7	2,633333333		
18	2	2	1 D	*	0.47	0.37	0.4	1.6	1.6	1.7	1,633333333	4,43185457	34,11089678
18	2	2	1 E	*	0.67	0.51	0.615	1.5	1.5	1.3	1,433333333		
18	2	2	1 F	*	0.83	0.82	0.75	1	1.1	1.1	1,066666667	10,3063511	18,75791796
18	2	2	1 G	*	0.87	0.62	0.6975	0.9	0.9	1	0,933333333		
18	2	2	2 A	*	0.74	0.6	0.6825	1	1	1	1		
18	2	2	2 B	*	0.85	0.78	0.7675	2.1	2.1	1.9	2,033333333	8,56148614	26,09763278
18	2	2	2 C	*	0.49	0.38	0.4325	2.6	2.6	2.5	2,566666667		
18	2	2	2 D	*	0.18	0.21	0.1875	1.6	1.6	1.5	1,566666667	2,89177387	15,9427095
18	2	2	2 E	*	0.51	0.62	0.5675	1.7	1.8	1.5	1,666666667		
18	2	2	2 F	*	0.44	0.45	0.44	1.6	1.5	1.7	1,6	7,00174939	20,809627
18	2	2	2 G	*	0.68	0.66	0.6675	1	0.7	0.9	0,866666667		
18	2	2	3 A	*	0.83	0.78	0.6925	0.9	1	1	0,966666667	8,01023495	32,82675327
18	2	2	3 B	*	0.7	0.55	0.6175	1.1	1.1	1.1	1,1		
18	2	2	3 C	*	0.41	0.36	0.4	1.8	2.1	2.1	2		
18	2	2	3 D	*									
18	2	2	3 E	*	0.16	0.17	0.165	2.8	2.8	3	2,866666667	6,59277746	40
18	2	2	3 F	*	0.31	0.32	0.315	2.2	2.2	2.1	2,166666667		
18	2	2	3 G	*	0.58	0.54	0.6525	1.4	1.6	1.5	1,5		
18	2	2	4 A	*	0.77	0.53	0.605	0.8	1.1	1.1	1	6,83244862	14,9479399
18	2	2	4 B	*	0.52	0.66	0.615	1.5	1.4	1.4	1,433333333		
18	2	2	4 C	*	0.33	0.34	0.355	2.1	2.2	2.2	2,166666667		
18	2	2	4 D	*									
18	2	2	4 E	*	0.09	0.09	0.105	3.1	3.1	3	3,066666667	6,41802557	39,19561007
18	2	2	4 F	*	0.41	0.3	0.3425	2.2	2.6	2.4	2,4		
18	2	2	4 G	*	0.41	0.45	0.3925	1.6	1.9	1.9	1,8		
24	2	1	1 A	*	0.99	0.97	0.945	0.5	0.7	0.7	0,633333333	6,74117271	27,5857917
24	2	1	1 B	*	0.4	0.41	0.47	2.5	2.4	2.4	2,433333333		
24	2	1	1 C	*	0.39	0.36	0.4075	2.2	2.2	2.2	2,2		
24	2	1	1 D	*	0.26	0.28	0.2625	2.1	2.1	2.2	2,133333333	6,15622148	31,87436704
24	2	1	1 E	*	0.49	0.52	0.555	1.2	1.3	1.2	1,233333333		
24	2	1	1 F	*	0.77	0.59	0.63	0.9	1.1	1.1	1,033333333	8,10928491	29,72463692
24	2	1	1 G	*	0.95	1	0.97	0.4	0.5	0.6	0,5		
24	2	1	2 A	*	0.91	0.81	0.97	0.8	0.9	1	0,9		
24	2	1	2 B	*	0.42	0.39	0.4525	1.9	1.9	2.2	2	9,8748598	20,91242671
24	2	1	2 C	*	0.53	0.44	0.4625	1.9	2	2.2	2,033333333		
24	2	1	2 D	*	0.37	0.29	0.3675	2	2.2	1.9	2,033333333	7,42643826	31,22623897
24	2	1	2 E	*	0.49	0.47	0.5075	1.4	1.2	1.2	1,266666667		
24	2	1	2 F	*	0.51	0.47	0.5775	1.1	1.1	1.1	1,1	6,62668271	26,07118406

24	2	24	1	2 G	0.64	0.63	0.54	0.5	0.5775	0.6	0.9	0.8	0.766666667	5,13642668	45,05119379
24	2	24	1	3 A	0.31	0.32	0.7	0.69	0.505	0.9	0.9	0.9	0.9		
24	2	24	1	3 B	0.54	0.53	0.5	0.53	0.525	0.9	1.1	1.1	1,033333333		
24	2	24	1	3 C	0.28	0.26	0.3	0.29	0.2825	2	2	2.2	2,066666667		
24	2	24	1	3 D	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
24	2	24	1	3 E	0.16	0.13	0.2	0.14	0.1575	3	3	3.2	3,066666667		
24	2	24	1	3 F	0.24	0.24	0.31	0.28	0.2675	1.5	1.4	1.4	1,433333333	4,96613908	31,48395173
24	2	24	1	3 G	0.38	0.42	0.39	0.36	0.3875	1.5	1.7	1.7	1,633333333		
24	2	24	1	4 A	0.33	0.37	0.73	0.68	0.5275	0.7	0.7	0.9	0,766666667		
24	2	24	1	4 B	0.64	0.52	0.5	0.53	0.5475	0.9	0.9	1	0,933333333	26,0462998	38,65815014
24	2	24	1	4 C	0.26	0.33	0.31	0.29	0.2975	2.1	1.9	1.8	1,933333333		
24	2	24	1	4 D	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
24	2	24	1	4 E	0.15	0.15	0.34	0.32	0.24	3.1	3.1	2.9	3,033333333		
24	2	24	1	4 F	0.3	0.32	0.35	0.33	0.325	1.5	1.6	1.6	1,566666667	4,36838086	36,91210019
24	2	24	1	4 G	0.47	0.42	0.44	0.42	0.4375	1	1	1.1	1,033333333		
24	2	24	2	1 A	0.56	0.47	0.51	0.49	0.5075	0.9	0.9	0.7	0,833333333	8,0183541	25,13269005
24	2	24	2	1 B	0.32	0.28	0.33	0.27	0.3	2.8	2.8	2.8	2,8	5,770387	26,05489628
24	2	24	2	1 C	0.39	0.41	0.37	0.38	0.3875	2.7	2.7	2.7	2,7	8,77068784	26,95256214
24	2	24	2	1 D	0.34	0.24	0.28	0.27	0.2825	1.6	1.6	1.5	1,566666667		
24	2	24	2	1 E	0.42	0.43	0.5	0.47	0.455	1.2	1.2	1.2	1,2	10,6033396	20,97257502
24	2	24	2	1 F	0.63	0.55	0.6	0.55	0.5825	1	1.2	1.1	0,766666667	6,23183424	27,36432826
24	2	24	2	1 G	0.53	0.51	0.45	0.45	0.485	0.9	0.8	0.6	0,733333333	10,181757	28,64474948
24	2	24	2	2 A	0.57	0.53	0.51	0.52	0.5325	0.7	0.7	0.8	2,466666667	7,45693094	47,45176067
24	2	24	2	2 B	0.41	0.4	0.38	0.37	0.39	2.5	2.5	2.4	2,466666667		
24	2	24	2	2 C	0.33	0.32	0.3	0.28	0.3075	2.6	2.7	2.7	2,666666667		
24	2	24	2	2 D	0.3	0.32	0.2	0.22	0.26	1.5	1.5	1.5	1,5		
24	2	24	2	2 E	0.48	0.47	0.5	0.48	0.4825	1.5	1.5	1.3	1,433333333		
24	2	24	2	2 F	0.44	0.43	0.47	0.45	0.455	1.5	1.5	1.5	1,5		
24	2	24	2	2 G	0.64	0.61	0.57	0.55	0.5925	1	0.9	0.7	0,866666667		
24	2	24	2	3 A	0.65	0.67	0.67	0.67	0.6725	0.7	0.9	0.9	0,833333333		
24	2	24	2	3 B	0.44	0.44	0.53	0.45	0.465	0.9	1	1.2	1,033333333	7,45693094	47,45176067
24	2	24	2	3 C	0.41	0.38	0.29	0.28	0.34	1.9	1.9	1.9	1,9		
24	2	24	2	3 D	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
24	2	24	2	3 E	0.25	0.24	0.29	0.24	0.255	3.3	3.3	3.3	3,3		
24	2	24	2	3 F	0.31	0.31	0.36	0.28	0.315	3.3	3.3	3.1	3,233333333	7,4839257	42,03377732
24	2	24	2	3 G	0.5	0.43	0.49	0.45	0.48	1.5	1.6	1.3	1,466666667		
24	2	24	2	4 A	0.52	0.6	0.49	0.35	0.49	0.7	0.6	0.9	0,733333333		
24	2	24	2	4 B	0.48	0.43	0.69	0.64	0.56	0.7	0.7	0.7	0,7	5,73738907	32,35020102
24	2	24	2	4 C	0.33	0.32	0.33	0.32	0.325	1.9	1.9	1.9	1,9		
24	2	24	2	4 D	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
24	2	24	2	4 E	0.1	0.14	0.15	0.18	0.1425	2.4	2.5	2.6	2,5		
24	2	24	2	4 F	0.39	0.36	0.43	0.44	0.405	1.9	2.1	2.1	2,033333333	5,32362042	49,2092261
24	2	24	2	4 G	0.5	0.45	0.51	0.46	0.48	1.4	1.5	1.5	1,466666667		
21	2	21	1	1 A	1.16	1.75	1.14	1.16	1.3025	0.7	0.6	0.6	0,633333333	6,68706587	43,0141224
21	2	21	1	1 B	0.54	0.41	0.49	0.49	0.4825	2.5	2.4	2.4	2,433333333		
21	2	21	1	1 C	0.45	0.37	0.42	0.46	0.425	2.7	2.6	2.5	2,6		
21	2	21	1	1 D	0.26	0.23	0.17	0.13	0.1975	2.5	2.5	2.4	2,466666667	4,50770811	37,5090748
21	2	21	1	1 E	0.81	0.71	0.6	0.56	0.67	1.7	1.7	1.6	1,666666667		
21	2	21	1	1 F	0.73	0.61	0.67	0.61	0.655	1.2	1.1	1.1	1,1	11,9239576	14,47323544
21	2	21	1	1 G	0.52	0.48	0.63	0.55	0.545	0.4	0.6	0.6	0,533333333		
21	2	21	1	2 A	0.84	0.78	0.53	0.54	0.6725	0.7	0.8	0.9	0,8	9,40690325	32,8457043
21	2	21	1	2 B	0.49	0.47	0.47	0.47	0.475	1.5	1.5	1.6	1,533333333		
21	2	21	1	2 C	0.48	0.37	0.38	0.35	0.395	2.2	2.4	2.4	2,333333333		

21	2	1	2 D	0.34	0.25	0.27	0.21	0.2675	2.7	2.7	2.5	2,6333333333	6,6788952	20,1586451
21	2	1	2 E	0.54	0.57	0.59	0.54	0.56	1.7	1.7	1.7	1.7	12,6948525	14,866565
21	2	1	2 F	0.43	0.56	0.6	0.53	0.53	1.2	1.2	1.3	1,2333333333		
21	2	1	2 G	0.98	1.08	1.34	1.34	1.185	0.4	0.4	0.6	0,4666666667		
21	2	1	3 A	0.61	0.57	0.68	0.54	0.6	1.3	1.3	1.4	1,3333333333		
21	2	1	3 B	0.51	0.64	0.64	0.54	0.595	1.2	1.2	1.2	2,5333333333	3,70395266	48,1602771
21	2	1	3 C	0.39	0.36	0.39	0.4	0.3725	2.4	2.5	2.7			
21	2	1	3 D	*	*	*	*	*	*	*	*			
21	2	1	3 E	0.32	0.21	0.26	0.32	0.2775	3.3	3.3	3	3.2	9,38223524	13,13828174
21	2	1	3 F	0.44	0.37	0.6	0.4	0.4525	1.5	1.3	1	1,2666666667		
21	2	1	3 G	0.48	0.45	0.43	0.34	0.425	1.7	1.7	1.8	1,7333333333		
21	2	1	4 A	0.63	0.67	0.65	0.78	0.6825	1.1	1.1	1	1,0666666667		
21	2	1	4 B	0.78	0.92	0.72	0.68	0.775	1.4	1.4	1.5	1,4333333333	8,48064307	26,4592992
21	2	1	4 C	0.29	0.24	0.37	0.41	0.3275	2.5	2.5	2.4	2,4666666667		
21	2	1	4 D	*	*	*	*	*	*	*	*			
21	2	1	4 E	0.27	0.27	0.27	0.18	0.2475	3	2.8	2.8	2,8666666667	8,72612559	50,5829574
21	2	1	4 F	0.4	0.38	0.44	0.42	0.41	1.8	1.9	2	1,3333333333		
21	2	1	4 G	0.4	0.39	0.42	0.41	0.405	1.3	1.5	1.2	0,7333333333	5,68017214	37,34656316
21	2	2	1 A	1.01	1.11	0.66	0.7	0.87	0.6	0.8	0.8	1,2666666667	3,69771971	32,20346356
21	2	2	1 B	0.53	0.61	0.57	0.49	0.55	1.2	1.2	1.4	2,4666666667	9,06406752	3,824565073
21	2	2	1 C	0.36	0.44	0.5	0.48	0.445	2.6	2.4	2.4	0,6		
21	2	2	1 D	0.26	0.27	0.24	0.18	0.2375	2.4	2.4	2.6	0,7333333333		
21	2	2	1 E	0.47	0.49	0.63	0.51	0.525	1	1.1	1.2	1,1		
21	2	2	1 F	0.57	0.55	0.72	0.57	0.6025	0.6	0.8	0.8	0,6		
21	2	2	1 G	0.92	0.77	0.64	0.58	0.7275	0.6	0.6	0.6	0,6		
21	2	2	2 A	1.03	1.16	0.9	0.73	0.955	0.8	0.8	1	0,8666666667	8,25673199	13,1753266
21	2	2	2 B	0.5	0.49	0.56	0.49	0.51	1.2	1.2	1.4	1,2666666667	4,28585245	4,316617336
21	2	2	2 C	0.45	0.48	0.36	0.31	0.4	2.4	2.4	2.4	2,4	8,22313981	13,85921939
21	2	2	2 D	0.2	0.16	0.2	0.2	0.2175	1.8	1.8	2	1,8666666667	5,69967808	40,9726923
21	2	2	2 E	0.5	0.54	0.55	0.58	0.5425	1.2	1.2	1.4	1,2666666667		
21	2	2	2 F	0.41	0.55	0.59	0.52	0.5175	1.2	1.2	1.4	1,2666666667		
21	2	2	2 G	1.86	1.7	1.83	1.63	1.755	0.6	0.4	0.5	0,5		
21	2	2	3 A	0.5	0.52	0.63	0.69	0.585	1.2	1.2	1.4	1,2666666667		
21	2	2	3 B	0.42	0.42	0.62	0.57	0.5075	1.4	1.4	1.6	1,4666666667		
21	2	2	3 C	0.51	0.46	0.34	0.31	0.405	1.8	2	2	1,9333333333		
21	2	2	3 D	*	*	*	*	*	*	*	*			
21	2	2	3 E	0.31	0.26	0.28	0.21	0.265	3	3	3.2	3,0666666667	2,41887127	39,48981754
21	2	2	3 F	0.24	0.24	0.33	0.26	0.2675	3	3.2	3.2	3,1333333333	6,96977606	33,384567
21	2	2	3 G	0.54	0.51	0.55	0.59	0.5475	2	2.2	2.2	2,1333333333		
21	2	2	4 A	0.67	0.65	0.51	0.47	0.575	1	1	0.8	0,9333333333		
21	2	2	4 B	0.73	0.6	0.79	0.76	0.72	0.8	0.8	1	0,8666666667		
21	2	2	4 C	0.47	0.5	0.28	0.28	0.3825	2.2	2.2	2.2	2,2		
21	2	2	4 D	*	*	*	*	*	*	*	*			
21	2	2	4 E	0.15	0.15	0.15	0.14	0.1475	3.2	3.2	3.4	3,2666666667	4,7074039	36,25000581
21	2	2	4 F	0.44	0.36	0.44	0.39	0.4075	2.8	2.8	2.8	2,8		
21	2	2	4 G	0.47	0.48	0.48	0.47	0.475	2	2.2	2.2	2,1333333333		
26	2	1	1 A	1.85	1.69	1.12	0.98	1.41	0.9	0.9	0.9	0,9	16,6953944	23,7453472
26	2	1	1 B	0.5	0.52	0.52	0.57	0.5275	1.8	1.6	1.5	1,6333333333	11,2992473	34,1446085
26	2	1	1 C	0.53	0.51	0.45	0.41	0.475	1.9	1.9	2.1	1,9666666667	16,69099	28,8630428
26	2	1	1 D	0.37	0.4	0.36	0.32	0.3625	1.5	1.5	1.4	1,4666666667		
26	2	1	1 E	0.85	0.9	0.54	0.53	0.705	1	1.2	1.2	1,1333333333		
26	2	1	1 F	0.63	0.6	0.48	0.51	0.555	0.9	0.9	1	0,9333333333		
26	2	1	1 G	0.72	0.63	0.66	0.63	0.66	0.9	0.9	0.7	0,8333333333		
26	2	1	2 A	0.83	0.93	0.9	0.89	0.8875	0.9	0.9	0.9	0,9		

26	2	1	2 B	0.45	0.44	0.31	0.29	0.3725	1.8	1.8	1.7	1,766666667	20,2287628	23,1783395
26	2	1	2 C	0.27	0.19	0.23	0.19	0,2475	2.5	2.5	2.7	2,566666667	10,5378544	9,27478331
26	2	1	2 D	0.13	0.19	0.17	0.19	0,17	2.5	2.8	2.8	2,7	10,8139948	15,4074826
26	2	1	2 E	0.5	0.46	0.57	0.55	0,52	1.5	1.4	1.3	1,4		
26	2	1	2 F	0.46	0.5	0.56	0.56	0,515	1.2	1.2	1.2	1,2		
26	2	1	2 G	0.4	0.45	0.42	0.46	0,4325	0.9	1	1.2	1,033333333		
26	2	1	3 A	0.72	0.63	0.79	0.64	0,695	1.5	1.4	1.3	1,4		
26	2	1	3 B	0.53	0.53	0.47	0.52	0,5125	1.8	1.9	1.5	1,733333333	12,8690815	17,8336893
26	2	1	3 C	0.43	0.38	0.26	0.27	0,335	2.2	2.2	2.1	2,166666667		
26	2	1	3 D	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
26	2	1	3 E	0.3	0.22	0.34	0.29	0,2875	2.8	2.8	3	2,866666667	38,1138938	25,6981124
26	2	1	3 F	0.25	0.26	0.26	0.24	0,245	1.5	1.5	1.8	1,6		
26	2	1	3 G	0.58	0.54	0.54	0.5	0,54	1.5	1.5	1.7	1,566666667		
26	2	1	4 A	0.47	0.46	0.6	0.55	0,52	1.2	1.2	1.2	1,2		
26	2	1	4 B	0.46	0.43	0.39	0.37	0,4125	1.5	1.8	1.7	1,666666667	11,2144537	38,0779753
26	2	1	4 C	0.39	0.46	0.32	0.3	0,3675	2.7	2.7	2.8	2,733333333		
26	2	1	4 D	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
26	2	1	4 E	0.35	0.31	0.24	0.2	0,275	2.8	3	3.1	2,966666667	6,76942877	41,8153502
26	2	1	4 F	0.36	0.39	0.27	0.27	0,3225	2.6	2.7	2.7	2,666666667		
26	2	1	4 G	0.6	0.47	0.52	0.49	0,52	1.2	1.2	1.2	1,2		
26	2	2	1 A	0.96	0.89	1.49	1.12	1,115	0.7	0.6	0.6	0,633333333	17,0942708	22,6102967
26	2	2	1 B	0.45	0.44	0.52	0.56	0,4925	1.9	1.9	1.9	1,9		
26	2	2	1 C	0.4	0.39	0.4	0.37	0,39	2.2	2.2	2.2	2,2		
26	2	2	1 D	0.32	0.37	0.28	0.26	0,3075	1.8	1.9	1.7	1,8		
26	2	2	1 E	0.57	0.58	0.68	0.58	0,6025	1.2	1.3	1.3	1,2		
26	2	2	1 F	0.43	0.46	0.53	0.57	0,4975	0.9	0.9	0.9	0,9		
26	2	2	1 G	0.43	0.44	0.44	0.43	0,435	0.7	0.6	0.6	0,633333333	17,2085413	28,4328965
26	2	2	2 A	0.57	0.58	0.56	0.62	0,5625	0.9	0.9	0.9	0,9		
26	2	2	2 B	0.35	0.4	0.35	0.27	0,3425	1.8	1.8	1.9	1,833333333	19,0195509	25,5921392
26	2	2	2 C	0.29	0.32	0.25	0.29	0,2875	3	3	3.2	3,066666667	11,7096085	43,2887287
26	2	2	2 D	0.31	0.25	0.28	0.29	0,2825	1.6	1.6	1.7	1,633333333		
26	2	2	2 E	0.62	0.53	0.46	0.48	0,5225	1.3	1.4	1.5	1,4		
26	2	2	2 F	0.43	0.47	0.49	0.42	0,4525	1.3	1.3	1.2	1,3		
26	2	2	2 G	0.53	0.49	0.56	0.62	0,55	0.7	0.6	0.8	0,7		
26	2	2	3 A	0.53	0.54	0.51	0.53	0,5275	1.2	1.2	1.4	1,266666667	17,4115511	19,2790442
26	2	2	3 B	0.43	0.39	0.38	0.34	0,385	1.8	1.7	1.7	1,733333333	14,1955242	33,3465789
26	2	2	3 C	0.4	0.43	0.37	0.36	0,39	2.5	2.4	2.4	2,433333333		
26	2	2	3 D	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
26	2	2	3 E	0.31	0.23	0.26	0.21	0,2525	3.3	3.3	3	3,2		
26	2	2	3 F	0.31	0.28	0.29	0.29	0,2925	2	1.8	1.7	1,833333333	11,417143	33,3122068
26	2	2	3 G	0.44	0.49	0.56	0.48	0,4925	1.4	1.5	1.5	1,466666667		
26	2	2	4 A	0.45	0.43	0.44	0.42	0,435	1.1	1.1	1.2	1,133333333	10,5276429	33,9216613
26	2	2	4 B	0.46	0.48	0.48	0.46	0,47	1.1	1.1	1.2	1,133333333		
26	2	2	4 C	0.27	0.23	0.26	0.31	0,2675	3.3	3.3	3.2	3,266666667		
26	2	2	4 D	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
26	2	2	4 E	0.17	0.16	0.23	0.18	0,185	2.7	2.8	3	2,833333333	9,27631045	29,4522165
26	2	2	4 F	0.36	0.34	0.35	0.33	0,345	2.2	1.9	2.2	2,1		
26	2	2	4 G	0.55	0.47	0.53	0.49	0,51	1	1.3	1.3	1,2		
25	2	1	1 A	1.03	1.03	0.68	0.65	0,8475	0.8	0.8	0.9	0,833333333	17,0942708	35,2905039
25	2	1	1 B	0.43	0.42	0.4	0.44	0,4225	1.9	2.2	2.2	2,1		
25	2	1	1 C	0.48	0.44	0.44	0.45	0,4525	2.1	2	1.9	2		
25	2	1	1 D	0.41	0.45	0.41	0.42	0,4225	1.5	1.7	1.6	1,6		
25	2	1	1 E	0.54	0.42	0.57	0.59	0,53	1.2	1.1	1.2	1,166666667	9,6798348	33,1158611
25	2	1	1 F	0.59	0.58	0.51	0.52	0,55	0.7	0.8	0.9	0,8		
25	2	1	1 G	0.6	0.65	0.47	0.53	0,5625	0.6	0.6	0.6	0,6		

25	2	2 A	0.61	0.56	0.62	0.62	0.6025	0.7	0.7	0.7	19,0195509	20,865631
25	2	2 B	0.45	0.42	0.45	0.41	0.4325	1.6	1.6	1.6	11,7096085	23,002935
25	2	2 C	0.41	0.41	0.4	0.36	0.395	1.2	1.2	1.2	17,4115511	17,3316666
25	2	2 D	0.42	0.42	0.32	0.47	0.4775	1.1	1.1	1.1	14,1955242	25,4574913
25	2	2 E	0.55	0.5	0.47	0.39	0.4775	1.1	1.1	1.1	11,4171743	25,4558841
25	2	2 F	0.36	0.38	0.36	0.35	0.3625	1.1	1.1	1.1	10,5276429	25,7916082
25	2	2 G	0.47	0.47	0.51	0.48	0.4825	0.4	0.4	0.4	14,646976	9,7624976
25	2	3 A	0.63	0.55	0.47	0.51	0.54	0.9	0.9	1	17,5134516	14,7485115
25	2	3 B	0.41	0.45	0.41	0.4	0.4175	1.2	1.2	1.2	14,0414102	30,1846107
25	2	3 C	0.35	0.38	0.39	0.34	0.365	2.2	2	1.9	15,4125188	16,8312029
25	2	3 D	*	*	*	*	*	*	*	*	11,012906	33,9586392
25	2	3 E	0.3	0.32	0.32	0.32	0.315	3.6	3.6	3.5	12,9816121	40,6861479
25	2	3 F	0.45	0.46	0.39	0.39	0.4225	1.5	1.7	1.7	16,3560118	12,7746735
25	2	3 G	0.43	0.44	0.45	0.39	0.4275	1.3	1.5	1.5	11,3715551	42,4824006
25	2	4 A	0.52	0.64	0.52	0.51	0.5475	0.7	0.8	0.8	12,9773035	42,8304958
25	2	4 B	0.52	0.51	0.46	0.55	0.51	1.2	1	1.2	11,8802764	47,5394654
25	2	4 C	0.42	0.45	0.38	0.34	0.3975	2.2	2.2	2.1	17,7362423	30,7845481
25	2	4 D	*	*	*	*	*	*	*	*	17,333333333	0,733333333
25	2	4 E	0.42	0.3	0.32	0.37	0.3525	2.7	2.7	2.8	9,27631045	31,8688678
25	2	4 F	0.4	0.35	0.38	0.35	0.37	1.7	1.7	1.8	15,6406166	21,7903882
25	2	4 G	0.44	0.4	0.43	0.41	0.42	1.5	1.7	1.7	10,4013503	39,0719403
25	2	1 A	0.51	0.56	0.9	0.88	0.7125	1	1.1	1.2	14,646976	9,7624976
25	2	1 B	0.41	0.42	0.38	0.34	0.3875	2.6	2.4	2.4	17,5134516	14,7485115
25	2	1 C	0.44	0.42	0.48	0.44	0.445	1.9	2.1	2.1	14,0414102	30,1846107
25	2	1 D	0.4	0.39	0.36	0.3	0.3625	1.4	1.4	1.2	15,4125188	16,8312029
25	2	1 E	0.46	0.41	0.6	0.53	0.5	1.1	1.1	1.2	11,012906	33,9586392
25	2	1 F	0.48	0.47	0.5	0.53	0.495	0.9	0.9	1	12,9816121	40,6861479
25	2	1 G	0.46	0.45	0.54	0.44	0.4725	0.9	0.9	0.7	16,3560118	12,7746735
25	2	2 A	0.53	0.53	0.8	0.72	0.645	0.9	1.1	1.1	11,3715551	42,4824006
25	2	2 B	0.36	0.33	0.41	0.38	0.37	1.4	1.6	1.4	12,9773035	42,8304958
25	2	2 C	0.37	0.35	0.44	0.4	0.39	1.7	1.8	1.8	11,8802764	47,5394654
25	2	2 D	0.31	0.32	0.32	0.33	0.32	1.4	1.4	1.4	17,333333333	0,733333333
25	2	2 E	0.51	0.48	0.49	0.54	0.505	1.2	1.2	1.3	9,27631045	31,8688678
25	2	2 F	0.49	0.51	0.39	0.35	0.435	1	1	1.1	15,6406166	21,7903882
25	2	2 G	0.48	0.48	0.51	0.48	0.4875	0.9	1.1	1.1	10,4013503	39,0719403
25	2	3 A	0.53	0.51	0.57	0.54	0.5375	1.2	1.2	1.2	14,646976	9,7624976
25	2	3 B	0.55	0.47	0.4	0.36	0.445	1.2	1.2	1.4	17,5134516	14,7485115
25	2	3 C	0.34	0.39	0.31	0.32	0.34	2.3	2.3	2.3	14,0414102	30,1846107
25	2	3 D	*	*	*	*	*	*	*	*	15,4125188	16,8312029
25	2	3 E	0.35	0.37	0.44	0.38	0.385	3	3	2.7	11,012906	33,9586392
25	2	3 F	0.36	0.35	0.4	0.4	0.3775	2.6	2.6	2.6	12,9816121	40,6861479
25	2	3 G	0.47	0.43	0.49	0.46	0.4625	1.2	1.2	1.2	16,3560118	12,7746735
25	2	4 A	0.43	0.41	0.57	0.56	0.4925	0.9	0.9	0.9	11,3715551	42,4824006
25	2	4 B	0.49	0.43	0.5	0.46	0.47	0.9	0.9	0.7	12,9773035	42,8304958
25	2	4 C	0.38	0.39	0.38	0.32	0.3675	2.4	2.4	2.3	11,8802764	47,5394654
25	2	4 D	*	*	*	*	*	*	*	*	17,7362423	30,7845481
25	2	4 E	0.26	0.37	0.24	0.21	0.27	2.4	2.4	2.5	17,333333333	0,733333333
25	2	4 F	0.47	0.43	0.4	0.39	0.4225	2.4	2.5	2.6	9,27631045	31,8688678
25	2	4 G	0.45	0.43	0.4	0.42	0.42	1.4	1.6	1.6	15,6406166	21,7903882
27	2	1 A	0.88	0.86	1.22	1.14	1.025	0.7	0.6	0.4	17,5134516	14,7485115
27	2	1 B	0.45	0.46	0.64	0.54	0.5225	2.2	2.2	2.4	14,0414102	30,1846107
27	2	1 C	0.48	0.46	0.64	0.54	0.53	2	2	2	15,4125188	16,8312029
27	2	1 D	0.38	0.33	0.34	0.28	0.3325	2.2	2.2	2.2	11,012906	33,9586392
27	2	1 E	0.62	0.54	0.66	0.65	0.6175	1.6	1.6	1.8	12,9816121	40,6861479
27	2	1 F	0.67	0.65	0.66	0.63	0.6525	1.4	1.4	1.2	16,3560118	12,7746735
27	2	1 G	0.61	0.71	0.68	0.79	0.6975	0.8	0.8	0.6	11,3715551	42,4824006

27	2	1	2 A	0.71	0.74	0.65	0.7	0.5	0.6	0.4	0.5	1,933333333	21,5165421	30,8017014
27	2	1	2 B	0.46	0.49	0.465	0.465	2	2	1.8	2	2,666666667	13,3680255	26,4739706
27	2	1	2 C	0.44	0.37	0.35	0.3825	2,2	2,2	2,4	2,2	2,666666667	16,1217746	23,5417665
27	2	1	2 D	0.25	0.26	0.19	0.225	2,2	2,2	2,4	2,2	1,533333333	14,211984	37,2548926
27	2	1	2 E	0.67	0.64	0.45	0.5725	1,6	1,6	1,4	1,6	1,333333333	12,409138	48,5153492
27	2	1	2 F	0.51	0.45	0.42	0.47	1,2	1,4	1,4	1,4	1,333333333	9,30235853	24,210903
27	2	1	2 G	0.68	0.74	0.82	0.7725	0,6	0,6	0,6	0,6	2,066666667	10,8046239	41,6756232
27	2	1	3 A	0.67	0.73	0.67	0.7025	1	1	1	1	1,866666667	14,712545	50,7571125
27	2	1	3 B	0.58	0.51	0.52	0.5325	1,2	1,4	1,4	1,4	2,533333333	7,2182721	36,831434
27	2	1	3 C	0.5	0.47	0.4	0.4425	2,4	2,4	2,6	2,4	1,533333333	16,2073379	34,4832863
27	2	1	3 D	*	*	*	*	*	*	*	*	2,066666667	17,6607127	15,2064604
27	2	1	3 E	0.46	0.38	0.25	0.4225	3	2,8	2,8	2,2	1,333333333	13,5148147	19,5505937
27	2	1	3 F	0.47	0.41	0.48	0.455	1,4	1,4	1,4	1,4	1,333333333	15,3037177	25,2247003
27	2	1	3 G	0.58	0.49	0.42	0.52	1,4	1,4	1,4	1,4	2,166666667	10,2255631	38,9278166
27	2	1	4 A	0.5	0.5	0.5	0.56	1	1	1,2	1,2	2,333333333	8,54121658	12,840317
27	2	1	4 B	0.59	0.49	0.5	0.535	1,2	1,2	1	1	0,966666667	13,70784	42,5878301
27	2	1	4 C	0.39	0.34	0.29	0.3525	2	2	2	2	1,333333333	11,2992473	39,6351501
27	2	1	4 D	*	*	*	*	*	*	*	*	1,466666667	16,69099	26,9686848
27	2	1	4 E	0.46	0.45	0.32	0.3775	2	2	2,2	2,2	0,733333333	16,69099	26,9686848
27	2	1	4 F	0.49	0.47	0.55	0.51	1,8	1,8	2	2	0,933333333	11,1223982	
27	2	1	4 G	0.58	0.53	0.54	0.54	1,2	1,2	1	1	2,333333333	22,7859775	
27	2	1	1 A	0.67	0.66	0.82	0.755	1	1	1	1	0,666666667	16,6953944	9,27478331
27	2	2	1 B	0.53	0.54	0.53	0.5275	2,4	2,4	2,6	2,6	2,333333333	11,2992473	39,6351501
27	2	2	1 C	0.46	0.48	0.48	0.48	2,4	2,6	2,6	2,6	1,466666667	16,69099	26,9686848
27	2	2	1 D	0.28	0.34	0.35	0.3125	1,4	1,4	1,4	1,4	2,066666667	10,2255631	38,9278166
27	2	2	1 E	0.77	0.73	0.81	0.76	1,6	1,6	1,4	1,4	1,333333333	15,3037177	25,2247003
27	2	2	1 F	0.56	0.65	0.61	0.5925	1,2	1	1,2	1,2	1,033333333	10,2255631	38,9278166
27	2	2	1 G	1,47	1,41	0,87	1,1375	0,7	0,7	0,7	0,7	3,033333333	22,7859775	11,1223982
27	2	2	2 A	0.77	0.66	0.97	0.8	1,2	1,1	1,1	1,1	2,333333333	16,6953944	9,27478331
27	2	2	2 B	0.47	0.47	0.52	0.5	2,1	2,1	2,3	2,3	2,333333333	11,2992473	39,6351501
27	2	2	2 C	0.37	0.41	0.46	0.4375	2,3	2,3	2,4	2,4	1,466666667	16,69099	26,9686848
27	2	2	2 D	0.25	0.26	0.27	0.2575	2,1	2,1	2,3	2,3	0,966666667	13,70784	42,5878301
27	2	2	2 E	0.71	0.62	0.81	0.725	1,4	1,6	1,6	1,6	1,333333333	11,2992473	39,6351501
27	2	2	2 F	0.46	0.43	0.56	0.4775	1,4	1,4	1,4	1,4	2,366666667	16,6953944	9,27478331
27	2	2	2 G	1,47	1,43	1,21	1,3775	0,5	0,5	0,5	0,5	3,033333333	22,7859775	11,1223982
27	2	2	3 A	0.69	0.63	0.69	0.66	1,1	1,1	0,9	0,9	2,333333333	16,6953944	9,27478331
27	2	2	3 B	0.59	0.63	0.63	0.5875	1,2	1,2	1,2	1,2	1,333333333	11,2992473	39,6351501
27	2	2	3 C	0.42	0.38	0.5	0.4525	1,7	1,8	1,9	1,8	1,466666667	16,69099	26,9686848
27	2	2	3 D	*	*	*	*	*	*	*	*	0,733333333	16,69099	26,9686848
27	2	2	3 E	0.29	0.23	0.34	0.2875	2,6	2,6	2,6	2,6	0,933333333	11,1223982	
27	2	2	3 F	0.3	0.38	0.44	0.3875	2,1	2,1	2,1	2,1	2,333333333	22,7859775	11,1223982
27	2	2	3 G	0.5	0.46	0.5	0.475	1,2	1,2	1,2	1,2	0,666666667	16,6953944	9,27478331
27	2	2	4 A	0.65	0.63	0.54	0.6225	0,9	0,9	1,1	1,1	2,333333333	11,2992473	39,6351501
27	2	2	4 B	0.54	0.58	0.49	0.515	1,4	1,4	1,2	1,2	1,466666667	16,69099	26,9686848
27	2	2	4 C	0.41	0.32	0.31	0.345	2,4	2,4	2,3	2,3	2,366666667	16,6953944	9,27478331
27	2	2	4 D	*	*	*	*	*	*	*	*	3,033333333	22,7859775	11,1223982
27	2	2	4 E	0.4	0.33	0.34	0.3425	3	3	3,1	3,1	2,333333333	16,6953944	9,27478331
27	2	2	4 F	0.39	0.42	0.42	0.425	2,3	2,3	2,4	2,4	1,466666667	11,2992473	39,6351501
27	2	2	4 G	0.58	0.41	0.49	0.4975	1,6	1,6	1,6	1,6	1,466666667	16,69099	26,9686848
29	2	1	1 A	1,4	1,35	1,6	1,45	0,6	0,6	0,8	0,8	2,333333333	11,2992473	39,6351501
29	2	1	1 B	0.56	0.44	0.46	0.455	2,2	2,4	2,4	2,4	1,466666667	16,69099	26,9686848
29	2	1	1 C	0.37	0.35	0.39	0.385	2,6	2,6	2,6	2,6	2,366666667	16,6953944	9,27478331
29	2	1	1 D	0.26	0.23	0.2	0.2225	1,6	1,6	1,6	1,6	1,466666667	11,2992473	39,6351501
29	2	1	1 E	0.55	0.54	0.57	0.5575	1,4	1,4	1,6	1,6	1,466666667	16,69099	26,9686848
29	2	1	1 F	0.56	0.56	0.64	0.585	1,2	1,2	1,2	1,2	0,733333333	16,69099	26,9686848
29	2	1	1 G	0.99	1,02	0.87	0.9425	0,8	0,8	0,6	0,6	0,933333333	16,69099	26,9686848
29	2	1	2 A	0.65	0.75	0.77	0.77	1	1	0,8	0,8	0,933333333	16,69099	26,9686848

29	2	1	2 B	0.53	0.48	0.43	0.4	0.46	2	2	1,8	1,933333333	20,2287628	22,0354058
29	2	1	2 C	0.43	0.38	0.41	0.33	0,3875	2,2	2,2	2,4	2,266666667	10,5378544	28,7924461
29	2	1	2 D	0.15	0.14	0.17	0.15	0,1525	2,4	2,6	2,8	2,6	10,8139948	35,1151874
29	2	1	2 E	0.55	0.53	0.58	0.62	0,57	1,8	1,8	2	1,866666667	12,8690815	33,1088352
29	2	1	2 F	0.54	0.57	0.62	0.57	0,575	1,6	1,6	1,6	1,6	6,7520131	3,2625626
29	2	1	2 G	1.01	1.02	0.86	0.83	0,93	0,4	0,4	0,4	0,4	11,2144537	25,5892809
29	2	1	3 A	0.59	0.65	0.58	0.62	0,61	1	1	1	1	5,89488797	36,3659385
29	2	1	3 B	0.46	0.45	0.59	0.44	0,49	1,8	1,8	2	1,866666667	5,69987208	19,5961374
29	2	1	3 C	0.38	0.45	0.45	0.36	0,41	2	2	2,2	2,066666667	9,06052732	20,3272597
29	2	1	3 D	*	*	*	*	*	*	*	*	*	4,13524847	34,0167438
29	2	1	3 E	0.21	0.16	0.23	0.25	0,2125	3	3	3,2	3,066666667	8,44290161	23,1431341
29	2	1	3 F	0.27	0.31	0.35	0.32	0,3025	2,2	2,2	2,4	2,266666667	9,71043867	36,7620655
29	2	1	3 G	0.51	0.51	0.53	0.52	0,5175	1,2	1,2	1,2	1,2	5,47351859	37,8109266
29	2	1	4 A	0.43	0.43	0.43	0.43	0,43	2,4	2,4	2,4	2,4	6,969626	30,0284198
29	2	1	4 B	0.52	0.51	0.53	0.44	0,5	1,4	1,2	1,2	1,1,333333333	8,26887555	42,2316718
29	2	1	4 C	0.33	0.28	0.39	0.29	0,3225	2,6	2,6	2,8	2,666666667	8,55917633	25,4774042
29	2	1	4 D	*	*	*	*	*	*	*	*	*	13,6783166	46,6374909
29	2	1	4 E	0.22	0.18	0.12	0.19	0,1775	2,6	2,6	2,8	2,666666667	17,4160183	19,8784752
29	2	1	4 F	0.28	0.33	0.25	0.22	0,27	2,2	2,2	2,2	2,2	19,5844929	24,1338894
29	2	1	4 G	0.45	0.43	0.58	0.45	0,4775	1	1,1	1,2	1,1	1,866666667	161
29	2	1	1 A	1.4	1.39	0.87	0.9	1,14	0,7	0,8	0,8	0,766666667	6,76942877	25,4916998
29	2	2	1 B	0.43	0.42	0.4	0.43	0,42	2,4	2,5	2,4	2,4,333333333	9,06619164	21,4120054
29	2	2	1 C	0.4	0.33	0.35	0.31	0,3475	2,6	2,6	2,3	2,5	5,89488797	36,3659385
29	2	2	1 D	0.34	0.29	0.33	0.26	0,3005	1,9	1,9	2	1,933333333	5,69987208	19,5961374
29	2	2	1 E	0.52	0.54	0.46	0.53	0,5125	1,6	1,7	1,5	1,6	9,06052732	20,3272597
29	2	2	1 F	0.49	0.47	0.54	0.52	0,505	1,2	1,2	1,3	1,233333333	4,13524847	34,0167438
29	2	2	1 G	0.89	0.78	0.72	0.76	0,7875	0,7	0,7	0,7	0,7	8,44290161	23,1431341
29	2	2	2 A	0.85	0.87	1.07	1.04	0,9575	0,6	0,6	0,6	0,6	9,71043867	36,7620655
29	2	2	2 B	0.48	0.44	0.55	0.57	0,51	1,8	1,8	1,7	1,766666667	5,47351859	37,8109266
29	2	2	2 C	0.38	0.39	0.32	0.37	0,365	2,7	2,7	2,5	2,633333333	6,969626	30,0284198
29	2	2	2 D	0.22	0.19	0.25	0.21	0,2175	1,8	1,9	1,9	1,866666667	8,26887555	42,2316718
29	2	2	2 E	0.62	0.61	0.62	0.63	0,62	1,8	1,8	1,9	1,833333333	8,55917633	25,4774042
29	2	2	2 F	0.49	0.45	0.46	0.47	0,4675	1,5	1,5	1,5	1,5	13,6783166	46,6374909
29	2	2	2 G	0.92	0.91	0.86	0.99	0,92	0,7	0,6	0,7	0,666666667	17,4160183	19,8784752
29	2	2	3 A	0.7	0.65	0.87	0.71	0,7325	0,9	0,9	1	0,933333333	19,5844929	24,1338894
29	2	2	3 B	0.59	0.64	0.57	0.51	0,5775	1	1,1	1,1	1,066666667	5,47351859	37,8109266
29	2	2	3 C	0.64	0.55	0.56	0.52	0,5675	1,6	1,8	1,8	1,733333333	6,969626	30,0284198
29	2	2	3 D	*	*	*	*	*	*	*	*	*	8,26887555	42,2316718
29	2	2	3 E	0.42	0.43	0.26	0.33	0,36	3	3	2,8	2,933333333	8,55917633	25,4774042
29	2	2	3 F	0.36	0.37	0.38	0.3	0,3525	2,4	2,4	2,6	2,466666667	13,6783166	46,6374909
29	2	2	3 G	0.59	0.49	0.59	0.65	0,58	1,4	1,4	1,4	1,4	17,4160183	19,8784752
29	2	2	4 A	0.46	0.58	0.55	0.53	0,53	1,1	1,1	1,1	1,1	19,5844929	24,1338894
29	2	2	4 B	0.6	0.62	0.65	0.56	0,6075	1,2	1,2	1,1	1,166666667	5,47351859	37,8109266
29	2	2	4 C	0.38	0.34	0.32	0.46	0,375	2,5	2,5	2,4	2,466666667	6,969626	30,0284198
29	2	2	4 D	*	*	*	*	*	*	*	*	*	8,26887555	42,2316718
29	2	2	4 E	0.16	0.14	0.16	0.14	0,15	2,5	2,7	2,7	2,633333333	8,55917633	25,4774042
29	2	2	4 F	0.37	0.42	0.37	0.35	0,3775	1,8	1,8	2	1,866666667	13,6783166	46,6374909
29	2	2	4 G	0.58	0.53	0.6	0.48	0,5475	1,5	1,5	1,4	1,466666667	17,4160183	19,8784752
30	2	1	1 A	1.81	2.08	2.03	1.83	1,8375	0,8	0,8	0,9	0,833333333	19,5844929	24,1338894
30	2	1	1 B	0.48	0.49	0.52	0.5	0,4975	0,9	1,1	1,1	1,033333333	5,47351859	37,8109266
30	2	1	1 C	0.51	0.45	0.36	0.4	0,43	1	1,2	1,2	1,133333333	6,969626	30,0284198
30	2	1	1 D	0.25	0.25	0.27	0.32	0,2725	2	2,1	2,1	2,066666667	8,26887555	42,2316718
30	2	1	1 E	0.64	0.59	0.7	0.71	0,66	2,2	2,2	2,2	2,2	8,55917633	25,4774042
30	2	1	1 F	0.57	0.63	0.59	0.57	0,59	1,8	1,8	1,8	1,8	13,6783166	46,6374909
30	2	1	1 G	0.66	0.56	0.98	0.96	0,79	0,7	0,5	0,6	0,6	17,4160183	19,8784752
30	2	1	2 A	1.18	1.13	1.32	1.26	1,2225	0,6	0,6	0,6	0,6	19,5844929	24,1338894
30	2	1	2 B	0.58	0.55	0.53	0.54	0,55	1,8	1,5	1,6	1,633333333	5,47351859	37,8109266
30	2	1	2 C	0.32	0.32	0.33	0.34	0,3275	1,9	1,9	1,8	1,866666667	6,969626	30,0284198

30	2	1	2 D	0.25	0.24	0.22	0.24	1.7	1.7	1.8	1,7333333333	15,1964687	24,6907206
30	2	1	2 E	0.57	0.56	0.53	0.565	1.1	1	1.2	1,1	16,2467143	22,8019107
30	2	1	2 F	0.65	0.73	0.55	0.6225	1.2	1.2	1.2	0,7	7,24117451	20,11289
30	2	1	2 G	0.41	0.48	0.65	0.5525	0.7	0.7	0.7	1,0333333333	13,5704464	9,27478331
30	2	1	3 A	0.65	0.56	0.76	0.6875	0.9	1.1	1.1	1,2666666667	8,34565126	34,7832165
30	2	1	3 B	0.56	0.52	0.53	0.5225	1.2	1.2	1.4	1,8666666667	16,5148547	14,2271268
30	2	1	3 C	0.3	0.31	0.37	0.3225	1.8	1.9	1.9	2,5333333333	11,3819848	22,8556236
30	2	1	3 D	*	*	*	*	*	*	*	0,8333333333	13,5704464	9,27478331
30	2	1	3 E	0.31	0.31	0.33	0.315	2.6	2.6	2.4	2,2666666667	16,5148547	14,2271268
30	2	1	3 F	0.61	0.59	0.54	0.555	1.4	1.4	1.4	1,4	18,2783457	16,6190793
30	2	1	3 G	0.6	0.55	0.6	0.59	1.2	1.2	1.4	1,2666666667	10,5912606	28,2049078
30	2	1	4 A	0.61	0.52	0.61	0.585	0.9	0.9	1	0,9333333333	17,7495851	17,7643067
30	2	1	4 B	0.51	0.57	0.55	0.55	0.9	0.9	0.8	0,8666666667	24,1280014	33,534796
30	2	1	4 C	0.29	0.31	0.29	0.3	2	2.1	2.1	2,0666666667	15,7621649	34,3341017
30	2	1	4 D	*	*	*	*	*	*	*	1,9666666667	12,9838869	36,6452165
30	2	1	4 E	0.17	0.13	0.37	0.245	2.4	2.2	2.2	2,2666666667	10,9584478	8,93692073
30	2	1	4 F	0.42	0.46	0.49	0.4725	1.8	1.9	1.7	1,9666666667	8,0004653	47,8697114
30	2	1	4 G	0.58	0.61	0.63	0.615	1	1.1	0.9	1	13,6333347	27,4766385
30	2	2	1 A	0.53	0.6	0.89	0.755	0.9	0.9	0.7	0,9333333333	13,7284245	32,7952193
30	2	2	1 B	0.48	0.47	0.46	0.4675	2.3	2.3	2.4	2,3333333333	8,24862751	32,7060771
30	2	2	1 C	0.38	0.35	0.38	0.3725	2.6	2.6	2.6	2,6	14,2590834	26,8177655
30	2	2	1 D	0.29	0.3	0.32	0.3125	1.4	1.4	1.2	1,3333333333	11,3819848	22,8556236
30	2	2	1 E	0.52	0.52	0.57	0.5375	1.2	1.2	1.4	1,2666666667	10,5912606	28,2049078
30	2	2	1 F	0.46	0.44	0.37	0.4075	0.9	0.9	1.1	0,9666666667	17,7495851	17,7643067
30	2	2	1 G	0.56	0.6	0.54	0.5625	0.7	0.7	0.6	0,6666666667	24,1280014	33,534796
30	2	2	2 A	0.52	0.55	0.7	0.595	0.9	0.9	0.7	0,8333333333	18,2783457	16,6190793
30	2	2	2 B	0.39	0.41	0.32	0.365	2.3	2.3	2.1	2,2333333333	10,5912606	28,2049078
30	2	2	2 C	0.28	0.27	0.32	0.3	2.6	2.6	2.4	2,5333333333	17,7495851	17,7643067
30	2	2	2 D	0.15	0.2	0.3	0.2375	1.6	1.6	1.2	1,5333333333	11,3819848	22,8556236
30	2	2	2 E	0.47	0.43	0.42	0.4375	1.1	1.2	1.2	1,1666666667	10,5912606	28,2049078
30	2	2	2 F	0.47	0.4	0.44	0.4425	1	1.1	1.1	1,0666666667	17,7495851	17,7643067
30	2	2	2 G	0.5	0.56	0.48	0.5075	0.7	0.7	0.7	0,7	18,2783457	16,6190793
30	2	2	3 A	0.68	0.62	0.58	0.6125	0.9	0.9	0.9	0,9	10,5912606	28,2049078
30	2	2	3 B	0.46	0.51	0.49	0.4825	1	1.2	1.2	1,1333333333	24,1280014	33,534796
30	2	2	3 C	0.38	0.31	0.38	0.37	1.7	1.7	1.6	1,6666666667	15,7621649	34,3341017
30	2	2	3 D	*	*	*	*	*	*	*	2,4666666667	12,9838869	36,6452165
30	2	2	3 E	0.27	0.26	0.35	0.31	2.6	2.4	2.4	2,4666666667	10,9584478	8,93692073
30	2	2	3 F	0.33	0.34	0.36	0.3525	2.3	2.3	2.4	2,3333333333	8,0004653	47,8697114
30	2	2	3 G	0.44	0.42	0.4	0.43	1.1	1.1	1.1	1,9666666667	13,633347	27,4766385
30	2	2	4 A	0.57	0.52	0.56	0.555	0.9	0.9	0.9	0,9333333333	13,7284245	32,7952193
30	2	2	4 B	0.51	0.49	0.53	0.51	1	1	1	1,7333333333	8,24862751	32,7060771
30	2	2	4 C	0.36	0.3	0.38	0.345	1.9	1.9	2.1	1,9666666667	14,2590834	26,8177655
30	2	2	4 D	*	*	*	*	*	*	*	2,5333333333	11,3819848	22,8556236
30	2	2	4 E	0.3	0.27	0.35	0.3075	2.4	2.6	2.6	2,5333333333	10,9584478	8,93692073
30	2	2	4 F	0.32	0.37	0.39	0.355	1.9	1.9	2.1	1,9666666667	8,0004653	47,8697114
30	2	2	4 G	0.49	0.47	0.44	0.4625	0.9	0.9	1	1,9666666667	13,633347	27,4766385
31	2	2	1 A	0.76	0.81	0.75	0.8825	0.7	0.7	0.7	0,9333333333	13,7284245	32,7952193
31	2	2	1 B	0.52	0.53	0.56	0.5275	1.7	1.6	1.9	1,7333333333	8,24862751	32,7060771
31	2	2	1 C	0.68	0.55	0.66	0.63	1.6	1.4	1.4	1,4666666667	14,2590834	26,8177655
31	2	2	1 D	0.52	0.48	0.41	0.4525	0.9	0.9	1	0,9333333333	10,9584478	8,93692073
31	2	2	1 E	0.7	0.69	0.65	0.6675	1	0.9	0.9	0,9333333333	8,0004653	47,8697114
31	2	2	1 F	0.67	0.56	0.61	0.6175	0.7	0.9	0.9	0,8333333333	13,633347	27,4766385
31	2	2	2 A	0.73	0.64	0.79	0.72	0.6	0.6	0.5	0,6	13,7284245	32,7952193
31	2	2	2 B	0.78	0.8	0.76	0.775	0.7	0.7	0.7	0,7	8,24862751	32,7060771
31	2	2	2 C	0.71	0.63	0.6	0.625	1.4	1.4	1.6	1,4666666667	14,2590834	26,8177655
31	2	2	2 D	0.48	0.41	0.56	0.465	1.4	1.4	1.4	1,4	10,9584478	8,93692073
31	2	2	2 E	0.47	0.4	0.41	0.4175	1.2	1.2	1.1	1,1666666667	8,0004653	47,8697114
31	2	2	2 F	0.55	0.55	0.54	0.545	1.1	1.1	1	1,0666666667	14,2590834	26,8177655
31	2	2	2 F	0.65	0.58	0.62	0.635	0.9	0.9	0.9	0,9	14,2590834	26,8177655

31	2	G	0.48	0.51	0.5	0.55	0.51	0.6	0.5	0.5	0.5	0.533333333		
31	2	3A	0.54	0.5	0.58	0.3	0.375	1.1	0.9	0.9	0.9	0.966666667		
31	2	3B	0.49	0.45	0.45	0.54	0.4825	1.1	1.1	0.9	1.1	1.033333333	34,7994598	7,07817288
31	2	3C	0.36	0.3	0.37	0.28	0.3275	2.1	2.1	1.9	2.1	2.033333333		
31	2	3D	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
31	2	3E	0.34	0.4	0.37	0.35	0.365	3	3	2.8	2.8	2.933333333		
31	2	3F	0.28	0.29	0.35	0.32	0.31	2.1	2.1	2.3	2.3	2.166666667	30,8297856	9,30125292
31	2	3G	0.75	0.69	0.6	0.6675	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1		
31	2	4A	0.55	0.47	0.43	0.48	0.4825	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9		
31	2	4B	0.45	0.45	0.56	0.55	0.5025	0.9	0.9	0.7	0.7	0.833333333	29,661696	10,3299834
31	2	4C	0.33	0.28	0.28	0.33	0.305	2.3	2.4	2.4	2.4	2.366666667		
31	2	4D	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
31	2	4E	0.23	0.25	0.22	0.2	0.225	2.4	2.4	2.3	2.3	2.366666667		
31	2	4F	0.54	0.41	0.42	0.41	0.445	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	43,4488163	10,4251857
31	2	4G	0.58	0.58	0.53	0.52	0.5525	1.1	1.1	1.2	1.2	1.133333333		
31	2	1A	0.77	0.69	0.7	0.65	0.7025	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5		
31	2	1B	0.65	0.67	0.56	0.53	0.6025	1.2	1.2	1.4	1.4	1.266666667	9,27478331	15,6288678
31	2	1C	0.49	0.54	0.42	0.43	0.47	1.2	1.4	1.4	1.4	1.333333333		
31	2	1D	0.44	0.42	0.31	0.35	0.38	1.4	1.4	1.6	1.6	1.466666667	31,9081283	8,51939284
31	2	1E	0.6	0.54	0.51	0.46	0.5275	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9		
31	2	1F	0.73	0.74	0.53	0.62	0.655	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	42,4074892	14,2870918
31	2	1G	0.67	0.73	0.59	0.69	0.67	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6		
31	2	1H	0.59	0.49	0.79	0.76	0.6575	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5		
31	2	2A	0.66	0.55	0.55	0.63	0.5975	1.2	1.2	1.4	1.4	1.266666667	15,2215916	11,5309817
31	2	2B	0.66	0.55	0.42	0.42	0.425	1.4	1.4	1.4	1.4	1.466666667		
31	2	2C	0.4	0.38	0.39	0.35	0.38	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	27,7890919	8,24862751
31	2	2D	0.56	0.54	0.5	0.49	0.5225	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9		
31	2	2E	0.54	0.59	0.57	0.56	0.565	0.9	0.9	1	1	0.933333333		
31	2	2F	0.74	0.74	0.7	0.72	0.725	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	31,2884265	13,3650791
31	2	3A	0.58	0.54	0.61	0.59	0.58	0.9	0.9	1	1	0.933333333		
31	2	3B	0.44	0.47	0.44	0.41	0.44	1	1.1	1.1	1.1	1.066666667	47,1619806	7,07817288
31	2	3C	0.36	0.31	0.39	0.38	0.36	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3		
31	2	3D	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
31	2	3E	0.44	0.35	0.36	0.37	0.38	2.4	2.3	2.1	2.1	2.266666667		
31	2	3F	0.38	0.35	0.34	0.3	0.3425	1.4	1.4	1.2	1.2	1.333333333	33,68756	9,30125292
31	2	3G	0.5	0.43	0.52	0.53	0.495	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1		
31	2	4A	0.42	0.48	0.4	0.49	0.4475	1	1.2	1.2	1.2	1.133333333		
31	2	4B	0.46	0.44	0.44	0.35	0.4275	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	29,6395904	10,4948736
31	2	4C	0.28	0.29	0.22	0.24	0.2575	2.6	2.6	2.6	2.6	2.666666667		
31	2	4D	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
31	2	4E	0.23	0.24	0.26	0.27	0.25	2.1	2.3	2.6	2.6	2.333333333	46,9326398	10,9432061
31	2	4F	0.35	0.33	0.35	0.33	0.34	0.9	0.9	0.9	0.9	1.866666667		
31	2	4G	0.49	0.45	0.54	0.44	0.48	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9		
28	2	1A	0.87	0.86	0.81	0.88	0.855	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4		
28	2	1B	0.46	0.47	0.47	0.46	0.47	2	2.2	2.2	2.2	2.133333333	38,9774525	18,5005625
28	2	1C	0.48	0.43	0.41	0.38	0.425	2.2	2.4	2.4	2.4	2.333333333		
28	2	1D	0.3	0.28	0.33	0.27	0.295	2.2	2.2	2.4	2.4	2.266666667	54,1263098	11,4029893
28	2	1E	0.39	0.4	0.43	0.49	0.4275	1.8	1.8	1.6	1.6	1.733333333		
28	2	1F	0.56	0.62	0.63	0.54	0.5875	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	31,1037462	16,3805941
28	2	1G	0.52	0.55	0.54	0.54	0.5375	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8		
28	2	2A	0.6	0.63	0.52	0.58	0.5825	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4		
28	2	2B	0.58	0.59	0.52	0.45	0.535	1	1	1.2	1.2	1.066666667	38,2718187	16,1571543
28	2	2C	0.54	0.54	0.41	0.41	0.4775	1.8	1.8	1.6	1.6	1.733333333		
28	2	2D	0.39	0.34	0.36	0.32	0.3525	1.8	1.8	2	2	1.866666667	38,9239533	11,9643011
28	2	2E	0.5	0.49	0.39	0.39	0.4425	1.2	1.2	1	1	1.133333333		
28	2	2F	0.48	0.49	0.57	0.53	0.5175	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	29,7096375	18,9668352
28	2	3A	0.57	0.53	0.52	0.46	0.5075	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9		
28	2	3B	0.48	0.48	0.55	0.46	0.5275	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	43,3006362	11,5072979
28	2	3C	0.42	0.45	0.48	0.49	0.4875	1.2	1.2	1.4	1.4	1.266666667		
28	2	3D	0.42	0.45	0.41	0.35	0.4075	1.8	1.8	1.8	1.8	1.733333333		

32	2	1	4 B	0,45	0,55	0,45	0,42	0,4675	1,2	1,2	1,2	1,2	15,1970876	27,4694812
32	2	1	4 C	0,25	0,25	0,26	0,26	0,2525	2,4	2,2	2,2	2,2	10,584548	30,5730497
32	2	1	4 D	0,33	0,26	0,28	0,28	0,2925	2,4	2,4	2,4	2,4	11,5171732	9,27478331
32	2	1	4 E	0,31	0,29	0,35	0,35	0,3125	1,8	1,8	1,6	1,6	10,6334914	46,3092795
32	2	1	4 F	0,39	0,35	0,38	0,38	0,3625	1,6	1,6	1,8	1,8	18,8119098	27,0587637
32	2	1	4 G	0,93	0,83	0,84	0,83	0,8575	1	1	1,2	1,2	14,6323408	19,776274
32	2	2	1 A	0,49	0,41	0,43	0,39	0,4225	2	2,2	2,2	2,2	8,52153828	23,3448062
32	2	2	1 B	0,38	0,37	0,36	0,35	0,365	2	1,8	1,8	1,8	14,3669303	20,7300954
32	2	2	1 C	0,29	0,34	0,27	0,27	0,3	1,6	1,6	1,6	1,6	13,2192547	40,1529374
32	2	2	1 D	0,46	0,45	0,41	0,41	0,45	1,4	1,4	1,4	1,4	9,9092761	34,1057997
32	2	2	1 E	0,51	0,56	0,52	0,49	0,52	1	1	1,1	1,1	4,83299121	25,655707
32	2	2	1 F	0,51	0,54	0,43	0,43	0,4775	0,8	0,8	0,6	0,6	11,6359405	32,315943
32	2	2	1 G	0,93	1,02	0,92	0,92	0,935	1,2	1,2	1,2	1,2	2,666666667	1,866666667
32	2	2	2 A	0,37	0,35	0,34	0,35	0,3525	2	2	2	2	2,666666667	2,666666667
32	2	2	2 B	0,36	0,39	0,35	0,38	0,37	2	2,2	2,2	2,2	1,866666667	1,866666667
32	2	2	2 C	0,36	0,39	0,35	0,38	0,37	2	2,2	2,2	2,2	1,866666667	1,866666667
32	2	2	2 D	0,21	0,18	0,26	0,3	0,2375	1,8	1,8	1,6	1,6	1,866666667	1,866666667
32	2	2	2 E	0,46	0,45	0,43	0,47	0,4525	1,5	1,6	1,4	1,4	1,866666667	1,866666667
32	2	2	2 F	0,54	0,55	0,56	0,57	0,555	1	1	0,8	0,8	1,866666667	1,866666667
32	2	2	2 G	0,71	0,61	0,63	0,62	0,6425	0,9	0,9	0,9	0,9	1,866666667	1,866666667
32	2	2	3 A	0,59	0,56	0,55	0,53	0,575	1,2	1,2	1	1	1,866666667	1,866666667
32	2	2	3 B	0,42	0,37	0,35	0,32	0,365	1,4	1,4	1,4	1,4	1,866666667	1,866666667
32	2	2	3 C	0,32	0,35	0,26	0,24	0,2925	1,8	1,8	2	2	1,866666667	1,866666667
32	2	2	3 D	0,2	0,25	0,21	0,21	0,215	2,4	2,6	2,2	2,2	1,866666667	1,866666667
32	2	2	3 E	0,35	0,34	0,36	0,39	0,36	2,2	2,2	2,4	2,4	1,866666667	1,866666667
32	2	2	3 F	0,4	0,42	0,4	0,39	0,4025	1,4	1,4	1,4	1,4	1,866666667	1,866666667
32	2	2	3 G	0,47	0,55	0,43	0,4	0,4625	0,8	0,8	1	1	1,866666667	1,866666667
32	2	2	4 A	0,51	0,51	0,48	0,42	0,48	1	1	1,2	1,2	1,866666667	1,866666667
32	2	2	4 B	0,33	0,23	0,27	0,27	0,2825	2	2	2,2	2,2	1,866666667	1,866666667
32	2	2	4 C	0,2	0,17	0,2	0,17	0,185	2,6	2,6	2,8	2,8	1,866666667	1,866666667
32	2	2	4 D	0,19	0,16	0,2	0,18	0,1825	2,6	2,8	3	3	1,866666667	1,866666667
32	2	2	4 E	0,3	0,35	0,34	0,34	0,3325	1,8	1,8	2	2	1,866666667	1,866666667
32	2	2	4 F											
32	2	2	4 G											

IX. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. L. – F. Litzke für die Überlassung dieses Themas. Er hat mich bis zum Abschluss der Dissertation begleitet.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Steinmeyer und seiner MTA Fr. Singer für die tolle und außerordentlich nette Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken.

Vielen Dank auch an Herrn Prof. Siebert und Frau Dr. Burg – Roderfeld für die Betreuung bei der Hydroxyprolinbestimmung.

Vor allem möchte ich Dr. K. Failing für die Hilfe und die unendliche Geduld mit meinem statistischen Unverständnis danken.

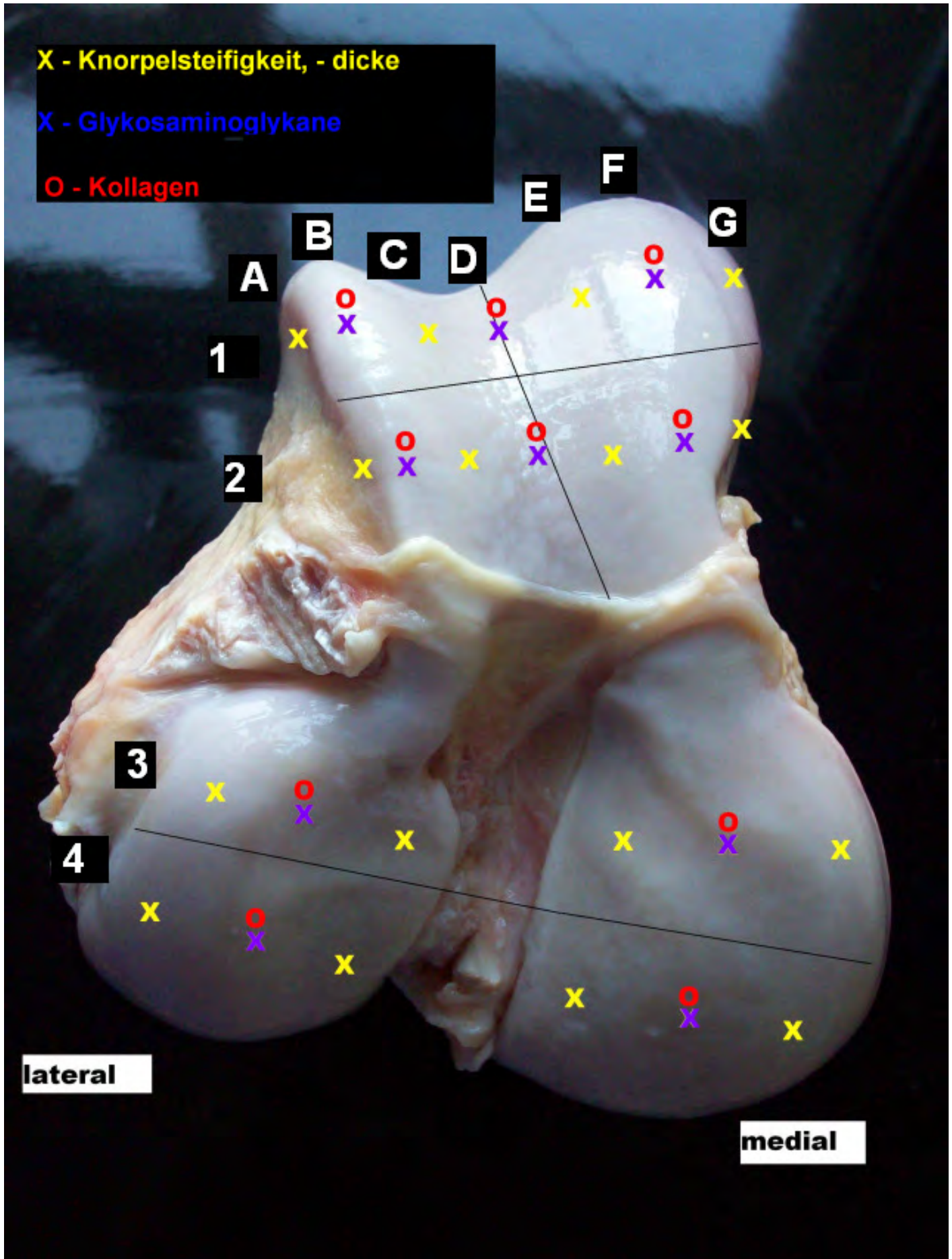
Danke an Emanuel Haasbach für die schlaun Einwände, ohne Dich hätte ich mein Laptop mehrmals zum Fenster rausgeworfen.

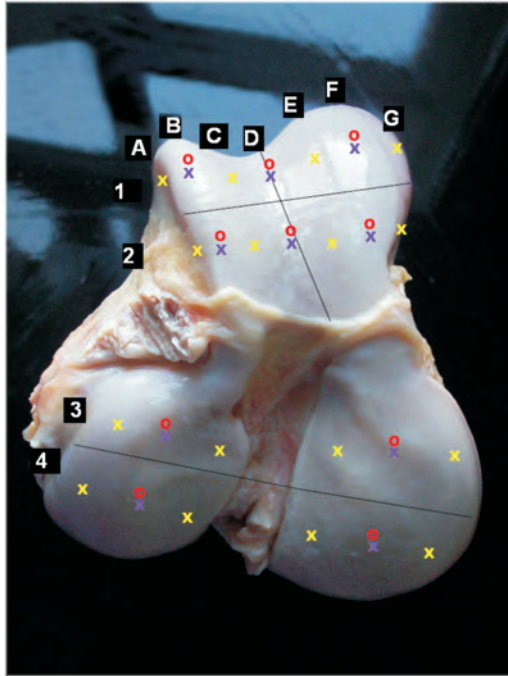
Vielen Dank an meine Eltern für die vielen unterstützenden und ermunternden Worte. Ohne Euch wäre das Durchhalten nicht möglich gewesen.

X - Knorpelsteifigkeit, - dicke

X - Glykosaminoglykane

O - Kollagen





édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5784-8



9 783835 195784 8