

Tobias Laurens Großner

Dr. med.

^{99m}Tc-Diphosphonat-Labeling

Eine neue Methode zur nicht-destruktiven Quantifikation von Hydroxylapatit und zur Bestimmung des osteogenen Potentials mesenchymaler Stammzellen

Fach: Orthopädie

Doktorvater: Priv. Doz. Dr. med. Tobias Gotterbarm

Die osteogene Differenzierung von Zellen zur Regeneration von Knochendefekten ist ein dynamisch rasant wachsender Sektor in der modernen Stammzellforschung. Die pluripotente Eigenschaft von mesenchymalen sowie adipogenen Stammzellen ermöglicht, unter definierten chemischen Bedingungen, die Differenzierung in die osteogene, chondrogene, adipogene und myogene Linie. Vor allem zur osteogenen Differenzierung werden weltweit unterschiedlichste Protokolle verwandt. Als wesentliches Charakteristikum bilden osteogen induzierten MSCs eine mineralisierende, extrazelluläre Matrix aus Hydroxylapatit. Um die erfolgreiche Differenzierung zu bestätigen und die entstandene Menge an Hydroxylapatit zu messen, dient die Alizarin Rot Färbung bisher weltweit als Goldstandard. Jedoch hat diese Methode, wie auch alle weiteren Nachweismethoden für Hydroxylapatit, wesentliche Nachteile. Zum einen werden die MSCs geschädigt, so dass diese Zellen weder weiter kultiviert werden können, noch für nachfolgende Experimente zur Verfügung stehen. Zum anderen handelt es sich um zeitaufwendige, komplizierte und oft kostspielige Verfahren, die bis auf wenige Ausnahmen, zum qualitativen oder semiquantitativen, nicht aber dem direkten quantitativen Nachweis der Osteogenese und damit der Berechnung der absoluten Menge an HA, eingesetzt werden. Aus wissenschaftlicher Sicht besteht vordringlich der Bedarf für eine neue in vitro Methode zur nicht-destruktiven Bestimmung, der von osteogen induzierten MSCs gebildeten absoluten Hydroxylapatitmenge.

^{99m}Tc-Technetium, gebunden an ein Diphosphonat (MDP, DPD, HDP), wird seit den 70er Jahren in der täglichen klinischen Routine der Nuklearmedizin verwandt. Die wesentliche Eigenschaft dieser Tracer besteht darin über das Polyphosphonat an Bereiche mit erhöhtem, osteoblastären, Knochenstoffwechsel zu binden. ^{99m}Tc-Technetium emittiert als Gammastrahler Photonen mit einer Energie von 140keV, die als Gammacounts mit einer Gammakamera gemessen werden. Die in vivo-Eigenschaften der ^{99m}Tc-Polyphosphonate konnten 2005 in vitro, an von MC3T3-Zellen der Maus gebildetem Hydroxylapatit, reproduziert werden.

Unter diesen Voraussetzungen wurde in der vorliegenden Arbeit zielführend in sechs Studien eine innovative Methode zur nicht-destruktiven Quantifikation der von osteogen induzierten, mesenchymalen Stammzellen gebildeten, absoluten Hydroxylapatitmenge, entwickelt.

Pilotversuche mit MSCs der Ziege und des Menschen in Monolayerkulturen belegten, dass sich ^{99m}Tc-MDP hervorragend eignet, um an das von osteogen induzierten, mesenchymalen Stammzellen der Ziege und des Menschen gebildete Hydroxylapatit zu binden, um die Menge an Hydroxylapatit und damit das osteogene Potential dieser Zellen zu bestimmen. Das neue Verfahren wies eine hohe signifikante Korrelation mit dem Goldstandard, der Alizarin Rot-Färbung nach, und wurde positiv intern und extern durch Korrelationsanalysen validiert. Im Folgeversuch wurde belegt, dass neben ^{99m}Tc-MDP alle gängigen, kommerziell erhältlichen ^{99m}Tc-Technetium-Tracer, auf der Basis von Diphosphonaten, (^{99m}Tc-DPD und ^{99m}Tc-HDP) nahezu gleichwertig zur Bindung an das von humanen MSCs in vitro gebildete Hydroxylapatit und damit zur Quantifizierung der entstandenen Menge an Mineral, befähigt sind.

Erfolgreich ließen sich die Erkenntnisse aus der Monolayerquantifikation auf ein 3D-Modell übertragen. Dazu wurden Kollagen-II-Scaffolds hergestellt, mit hMSCs besiedelt, kultiviert und nach Abschluss der Zellkultur, direkt mit dem Tracer ^{99m}Tc-HDP inkubiert, mit einer Gammakamera die gebundene Aktivität bestimmt und die Scaffolds histologisch aufgearbeitet und die Schnitte mit Alizarin Rot auf die Präsenz von Mineral gefärbt. Die Färbung wies nur in drei von sechs Scaffolds Mineral nach, jedoch wurde in den Scaffolds der osteogenen Gruppe durchweg ein

signifikant höherer Uptake des Tracers gegenüber der Kontrollgruppe gemessen. In einer weiteren Studie konnte bestätigt werden, dass ^{99m}Tc eine relevant höhere Sensitivität gegenüber den Standardmethoden besitzt und bereits zwischen den Tagen 5-7 der Zellkultur, die erfolgreiche osteogene Differenzierung nachweisen kann - die Alizarin Rot Methode hingegen erst zwischen dem 8. und 14. Tag. Durch Korrelation der laborchemisch bestimmten Konzentrationen von Calcium und Phosphat mit der Menge an adsorbiertem ^{99m}Tc war abschließend die absolute Quantifikation der Hydroxylapatitmenge durch das ^{99m}Tc -Labeling möglich.

Die vorgestellten Ergebnisse eröffnen neue Perspektiven für die Bestimmung des osteogenen Potentials unterschiedlichster Zelllinien. Unerlässlich ist die Optimierung von Inkubationszeiten und Aktivitätsmenge in zukünftigen Projekten. Ob und in welchem Ausmaß alternative Zellquellen, mit einer geringeren Entnahmemorbidity zur Verfügung stehen, um das osteogene Potential des Organismus zu bestimmen, wird Gegenstand weiterführender Forschung im Bereich der radioaktiven Isotopenquantifikation sein.

Erfolgreich kann mit dieser Arbeit erstmalig eine hoch-sensitive, nicht-destruktive und effiziente Methode zur frühzeitigen Quantifikation, der von osteogen induzierten mesenchymalen Stammzellen in der 2D- und 3D-Zellkultur gebildeten, absoluten Menge an Hydroxylapatit etabliert werden und dadurch gleichzeitig ein Rückschluss auf das osteogene Potential dieser Zellen erfolgen.