

Stefanie Elisabeth Wurm (ehem. Schmidt)
Dr. med.

In-vitro-Vergleich von Kollagen II- und Kollagen I/III-Membranen sowie Glykosaminoglykanbestimmung von Knorpellysaten und im Labor hergestellten Membran-Zell-Konstrukten anhand der ²³Na-Messung am 7-Tesla-MRT

Orthopädie

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Marcus Egermann

Die Therapie von Knorpeldefekten nimmt in der Orthopädie eine zentrale Rolle ein. Es existieren zahlreiche operative Methoden mit dem vorrangigen Ziel, Knorpelersatzgewebe zu schaffen, welches dem hyalinen Gelenkknorpel in seinen biochemischen und strukturellen Eigenschaften möglichst ähnlich ist.

Eine große Bedeutung im Rahmen der operativen Reparatur kommt dem Knorpel Tissue Engineering zu. Hierzu wird eine Membran (Scaffold) mit einer produktiven Zellquelle beladen und in die Defektregion eingesetzt. Mit dem vorliegenden Versuchsvorhaben sollte geklärt werden, ob es nach Besiedelung mit Knochenmarkskonzentrat und Induktion der chondrogenen Differenzierung Unterschiede in der Knorpelneubildung zwischen einer selbst hergestellten Kollagen II-Membran und einer kommerziell erworbenen Kollagen I/III-Membran gibt. Hierzu erfolgte die Aspiration von Knochenmark aus der proximalen Tibia der Kniegelenke des Göttinger Minipig sowie die anschließende Konzentration des Aspirats. Das Konzentrat wurde auf die Kollegenmembranen aufgebracht und nach In-vitro-Kultivierung histologisch aufbereitet sowie mittels Bern-Score ausgewertet. Es zeigte sich kein Unterschied bezüglich der Beladung und chondrogenen Differenzierung bei Kollagen I/III- und Kollagen II-Membranen. Jedoch konnte auf beiden Membranen kein zufriedenstellendes Ersatzgewebe hergestellt werden. Weitere Forschung ist hier sicherlich notwendig, zum Beispiel bezüglich der Oberflächenbeschaffenheit der Membranen. Da die Qualität und Quantität des verwendeten Knochenmarkskonzentrates von Spender zu Spender stark variierte, wäre die Entwicklung eines standardisierten Aufbereitungsverfahrens sicher hilfreich.

Zur Beurteilung von Knorpeldefekten sowie der Regeneratqualität gilt aktuell die MRT als Goldstandard. Die ²³Na-Sequenz hat sich bereits in unterschiedlichen Studien als vielversprechende Methode zur Knorpeldiagnostik erwiesen. Natrium-Moleküle sind im hyalinen Gelenkknorpel an die Sulfat- und Carboxylseitenketten von Glykosaminoglykanen gebunden. Da Glykosaminoglykane einen wichtigen

Hauptbestandteil des Knorpelgewebes darstellen, lässt die Bestimmung der Natrium-Konzentration Rückschlüsse auf den Glykosaminoglykangehalt und somit auf die Qualität des in-vivo- oder in-vitro-hergestellten Ersatzknorpelgewebes zu.

Zunächst wurde in dieser Arbeit überprüft, ob die nichtdestruktive und nichtinvasive ^{23}Na -Messung am 7-Tesla-MRT den aktuellen Methoden zur Glykosaminoglykan-Bestimmung ebenbürtig ist. Histologische Färbungen wie Safranin O/Fast Green und biochemische Verfahren, zum Beispiel mittels DMMB-Assay, existieren zur GAG-Bestimmung bereits, erfordern jedoch die unwiderrufliche Zerstörung des zu untersuchenden Biomaterials und eignen sich somit auch nur bedingt als alltägliche klinische Routinediagnostik. Daher wäre die Entwicklung nichtinvasiver diagnostischer Methoden zur Bestimmung des GAG-Gehaltes wünschenswert, die sich bestenfalls auch im klinischen Alltag anwenden lassen. Zunächst wurde im Rahmen dieser Arbeit die Glykosaminoglykan-Bestimmung mittels DMMB-Assay und ^{23}Na -Messung anhand von Knorpelbiopsaten verglichen. Hierzu erfolgte die Entnahme und Lyse von Knorpelproben aus der lateralen Femurkondyle des Kniegelenkes von Göttinger Minipigs. Im Anschluss wurde der Natrium- bzw. Glykosaminoglykan-Gehalt mittels ^{23}Na -Messung im 7-Tesla-MRT und mittels DMMB-Assay bestimmt. Da eine signifikante Korrelation nachgewiesen wurde, kann die nichtdestruktive ^{23}Na -Messung am 7-Tesla-MR-Tomographen als eine gleichwertige Methode zur Bestimmung von Glykosaminoglykanen bei Knorpelbiopsaten angesehen werden.

Zur Validierung der Methode erfolgte im Anschluss die Messung an intakten, chondrogen differenzierten Membran-Zell-Konstrukten mittels ^{23}Na -Natrium-Sequenz. Eine hochsignifikante Korrelation der Ergebnisse von ^{23}Na -Messung und DMMB-Assay lässt darauf schließen, dass die ^{23}Na -Sequenz dem DMMB-Assay ebenbürtig ist und auch bei sehr kleinen Zellkonstrukten angewendet werden kann. Sie bringt zudem den Vorteil der weiteren Verwendbarkeit der zu untersuchenden Konstrukte mit sich. Die begrenzte Verfügbarkeit von MR-Tomographen mit einer Feldstärke von 7 Tesla sowie die hohen Kosten und die lange Messzeit könnten jedoch der breiten Nutzung des Verfahrens im Wege stehen.

Deshalb wurde zuletzt überprüft, ob die deutlich schnellere Protonensequenz am 7-Tesla-MRT den bereits etablierten semiquantitativen histologischen Bewertungssystemen zur morphologischen Beurteilung von Knorpelregeneratgewebe qualitativ ebenbürtig ist. Hierzu erfolgte ein radiologischer und histologischer Vergleich der Knorpeldefektregenerate, welche an den Femurkondylen der porcinen Kniegelenke generiert und mit drei unterschiedlichen operativen Methoden versorgt wurden. Hierbei konnte jedoch keine statistisch relevante Korrelation zwischen dem radiologischen

Assessment der mit regulären Protonen-Sequenzen am 7-Tesla-MRT generierten Bilder mittels 2D-MOCART-Score und den etablierten semiquantitativen histologischen Scores (MODS, ICRS I, ICRS II) nachgewiesen werden.

Als Ergebnis dieser Arbeit ist also festzuhalten, dass sich die ^{23}Na -Messung am 7-Tesla-MRT zur nichtinvasiven Beurteilung von Knorpelläsionen ebenso wie von in-vitro-hergestelltem Knorpelregeneratgewebe eignet und somit eine innovative Alternative zu etablierten invasiven und destruktiven Methoden darstellt.