

# **TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN**

## **Fakultät für Medizin**

### **Kontrastmittelgestützte, zelluläre Magnetresonanztomographie zum *in vivo* Monitoring markierter mesenchymaler Stammzellen nach Implantation in osteochondrale Defekte im Kaninchenmodell**

**Stephan Masius**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen  
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Medizin**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Stephan Vogt

2. Prof. Dr. Marcus Makowski

Die Dissertation wurde am 15.10.2021 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.07.2022 angenommen



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Morphologie und Regeneration von hyalinem Gelenkknorpel.....	1
1.2. Therapie osteochondraler Defekte im Kniegelenk.....	3
1.3. Mesenchymale Stammzellen in der Therapie osteochondraler Defekte.....	4
1.4. Prinzip der Magnetresonanztomografie.....	5
1.5. Kontrastmittelgestützte zelluläre MRT .....	7
1.6. Ziel der Arbeit .....	8
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>9</b>
2.1. Material.....	9
2.1.1. Tiermodell .....	9
2.1.2. Zellen .....	10
2.1.3. Kontrastmittel Ferucarbotran (Resovist®).....	10
2.1.4. Verbrauchsmaterial /Chemikalien .....	11
2.1.5. Medikamente.....	12
2.1.6. Geräte .....	12
2.1.7. Software.....	13
2.1.8. Fibrinkleber .....	13
2.2. Methoden .....	14
2.2.1. Studiendesign.....	14
2.2.2. Stammzell-Fibrin-Implantate.....	15
2.2.3. Operative Eingriffe .....	16
2.2.3.1. Anästhesie.....	16
2.2.3.2. Implantation.....	17
2.2.4. MRT-Untersuchungen.....	19
2.2.5. Statistische Auswertung.....	26
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>27</b>
3.1. Allgemeine Ergebnisse.....	27
3.2. PD STIR Sequenz in sagittaler Ebene .....	27
3.2.1. Signal zu Rausch Verhältnis .....	27
3.2.2. Messung des Knochenödems .....	30
3.3. T1 TSE Sequenz in sagittaler Ebene .....	31
3.4. PD SPIR Sequenz in transversaler Ebene .....	34

3.4.1. Synovialmembran.....	34
3.4.2. Kniegelenkserguss.....	35
3.5. T2-gewichtete Sequenz .....	36
3.6. T2*-gewichtete Sequenz .....	40
3.7. Bildmorphologische Untersuchung.....	44
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>46</b>
4.1. Tiermodell .....	46
4.2. Einfluss der Operationsmethode auf das Kniegelenk in Abhängigkeit der Zellmarkierung.....	47
4.3. Messergebnisse der Implantate .....	49
4.3.1. PD SPIR Sequenz .....	50
4.3.2. T1-gewichtete Sequenz .....	51
4.3.3. T2-gewichtete Sequenz .....	52
4.3.4. T2*-gewichtete Sequenz .....	53
4.3.5. Schlussfolgerung und Beurteilung der Implantat Messungen .....	54
4.4. Bildmorphologische Beurteilung des Regeneratgewebes.....	58
4.5. Ausblick .....	59
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>60</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>61</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>74</b>
<b>8. Danksagung.....</b>	<b>75</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Fläche
Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
ACT	Autologe Chondrozyten Transplantation
AMV	Atemminutenvolumen
ASC	<i>adipose tissue derived stem cells</i>
B <sub>0</sub>	Magnetfeldstärke
BMSC	<i>bone marrow derived stem cells</i>
ca.	circa
cm/cm <sup>2</sup>	Zentimeter, Quadratzentimeter
dGEMRIC	<i>delayed gadolinium-enhanced MRI of cartilage</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
eGFP	<i>enhanced Green Fluorescent Protein</i>
et al.	<i>et alii</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
(F)SE	<i>(Fast) Spin-Echo</i>
FOV	<i>Field of view</i>
g, µg	Gramm, Mikrogramm
G	G-Kraft
ggf.	gegebenenfalls
GRASP	<i>Gradient echo Acquisition for Superparamagnetic Particles</i>
GRE	Gradienten Echo
h	Stunde
IQR	<i>Interquartile range</i> (Interquartilbereich)
kg KG	Kilogramm Körpergewicht
HF	Hochfrequenz
IL-1	Interleukin-1
KM	Kontrastmittel
l, ml	Liter, Milliliter
m, mm, µm, mm <sup>3</sup>	Meter, Millimeter, Mikrometer Kubikmillimeter
MACT	Matrixgestützte Autologe Chondrozyten Transplantation
min	Minute
MSC	Mesenchymale Stammzelle
MOCART	<i>magnetic resonance observation of cartilage repair tissue</i>
MRT	Magnetresonanztomografie
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NSAR	nicht steroidale Antirheumatika
NZW	<i>New Zealand White</i>
<i>p</i>	Asymptotische Signifikanz (zweiseitiger Test)

$p_x$	Exakte Signifikanz (zweiseitiger Test)
PBSC	<i>peripheral blood stem cells</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PD	Protonendichte
PET	Positronen-Emissions-Tomografie
Q	Quotient
R+, R-	Resovist®-markiert, Resovist®-unmarkiert
ROI	<i>Region of interest</i>
s.	siehe
S.	Seite
s, ms	Sekunde, Millisekunde
s.c.	<i>subcutan</i>
SD	<i>Standard deviation</i> (Standardabweichung)
(F)(T)SE	<i>(Fast)(Turbo) Spin Echo</i>
SI	Signalintensität
SNR	<i>signal to noise ratio</i> (Signal-zu-Rausch Verhältnis)
SPECT	Single Photon Emissions Computer Tomografie
SPIO	superparamagnetisches Eisenoxid
SPIR	<i>Spectral Presaturation with Inversion Recovery</i>
SpO <sub>2</sub>	periphere Sauerstoffsättigung
T, mT	Tesla, Millitesla
Tab.	Tabelle
TE	<i>Time Echo</i> (Echozeit)
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TR	<i>Time Repetition</i> (Repetitionszeit)
Vol.	Volumen

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des hyalinen Knorpels (Pool et al., 2001).....	1
Abbildung 2: T1-Relaxation (A) sowie T2- und T2*-Relaxation (B), (Ridgway, 2010).....	6
Abbildung 3: Studiendesign.....	15
Abbildung 4: Fertiges Fibrin-Stammzell-Implantat.....	16
Abbildung 5: Operative Implantation der Fibrin-Implantate.....	18
Abbildung 6: Untersuchungsaufbau im MRT .....	20
Abbildung 7: Beispiel der SNR Messung.....	22
Abbildung 8: Messungen in der transversalen PD SPIR Sequenz.....	23
Abbildung 9: Messmethode des Knochenödems in der PD SPIR Sequenz.....	24
Abbildung 10: Deskriptive Statistik und Boxplot in der PD SPIR Sequenz.....	28
Abbildung 11: Verlauf des SNR der Subgruppen in der PD SPIR Sequenz.....	29
Abbildung 12: PD SPIR: Repräsentative Abbildungen von R+ und R- Implantaten im Verlauf.....	30
Abbildung 13: $Q_{\text{odem}}$ zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten.....	31
Abbildung 14: Deskriptive Statistik und Boxplot in der T1 TSE Sequenz.....	32
Abbildung 15: Verlauf der SNR der Subgruppen in der T1 Sequenz.....	33
Abbildung 16: T1-Wichtung: Repräsentative Abbildungen von R+ und R- Implantaten im Verlauf .....	33
Abbildung 17: Vergleich der Synovialmembran-Dicke zu den Untersuchungszeitpunkten U1-U4 .....	35
Abbildung 18: Untersuchung des Kniegelenkergusses .....	36
Abbildung 19: Abnahme des SNR der einzelnen Echos in der T2 Sequenz.....	37
Abbildung 20: Deskriptive Statistik und Boxplot der T2 Zeiten.....	38
Abbildung 21: Verlauf der T2-Zeit der Subgruppen.....	39
Abbildung 22: T2-Wichtung: Repräsentative Abbildungen von R+ und R- Implantaten im Verlauf .....	40
Abbildung 23: Vergleich der SNR der T2* Echo 1-3 .....	41
Abbildung 24: Deskriptive Statistik und Boxplot der T2* Zeiten .....	42
Abbildung 25: Verlauf der T2*-Zeit der Subgruppen.....	43
Abbildung 26: T2*-gewichtete Sequenz, repräsentative Abbildung für R+ und R- Implantate .....	43
Abbildung 27: T2*-Maps, repräsentative Abbildung für R+ und R- Implantate .....	44
Abbildung 28: Vergleich der Gesamtergebnisse der modifizierten MOCART 2.0 Skala.....	45

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 2: Übersicht MRT Sequenzen .....	21
Tabelle 3: Skala angelehnt an den MOCART 2.0 Knee-Score (Schreiner, 2019, S.12) .....	25
Tabelle 4: Median und IQR der modifizierten MOCART 2.0 Skala.....	45



„...we shall find, that an ulcerated Cartilage is universally allowed to be a very troublesome Disease; that it admits of a Cure with more Difficulty than a carious Bone; and that, when destroyed, is never recovered.“ (Hunter, 1742, S. 520).

# 1. Einleitung

## 1.1. Morphologie und Regeneration von hyalinem Gelenkknorpel

Im Bereich der Gelenke sind die Knochen mit hyalinem Knorpel überzogen. Dieser besteht zu 60-80% aus Wasser, welches sich zum Teil in der extrazellulären Matrix (EZM) frei bewegen kann. Die EZM ist aus Kollagen, hauptsächlich vom Typ II, Proteoglykanen und nicht-kollagenen Proteinen beschaffen. Eingebettet sind hierin Chondrozyten, die nicht in direktem Zusammenhang zueinander stehen und per Diffusion versorgt werden (Newman, 1998, S. 309-11). Sie stammen aus dem Mesenchym und unterscheiden sich je nach Lage innerhalb der EZM in Form, Größe und Aktivitätszustand. Der Aktivitätszustand, bzw. die Fähigkeit zur Synthese der EZM nimmt mit dem Alter ab. In hyalinem Knorpel findet man generell keine Blutgefäße, Nerven oder Lymphbahnen (Buckwalter et al., 2005, S. 465-75). Aus der Avaskularität, der abnehmenden biologischen Aktivität sowie der Versorgung über Diffusion lässt sich die begrenzte Fähigkeit zur Selbstheilung erklären.

Der Gelenkknorpel besteht nicht aus einem durchgehend gleichartig aufgebauten Gewebe, sondern gliedert sich in 4 Zonen. (siehe Abbildung 1)

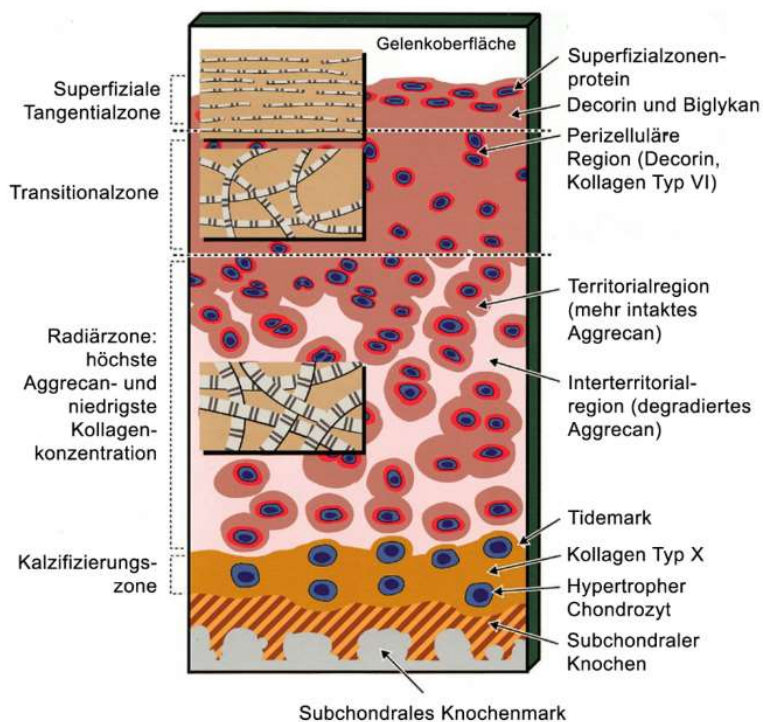


Abbildung 1: Aufbau des hyalinen Knorpels (Pool et al., 2001)

Kollagengehalt und Zellzahl nehmen zur Tiefe hin ab, hingegen verhalten sich Proteoglykangehalt und Fibrillendurchmesser gegenläufig.

Die Tangentialzone, welche die Gelenkflächen bildet, wird von parallel verlaufenden, zur Gelenkfläche parallel ausgerichteten Kollagenfibrillen dominiert, die über flachen Chondrozyten lagern. Durch die besondere Zusammensetzung hat diese Schicht die höchste Zugfestigkeit und dient als Schutz der darunterliegenden Zonen (Hunziker, 2002, S. 433; Pool et al., 2001, S. 28). Unter der Tangentialzone liegt die Transitionalzone, die als Übergang zur Radiärzone zu sehen ist. Das heißt die Zellform wird zunehmend sphärisch und der Wassergehalt nimmt ab. Dem Knochen am nächsten ist die Kalzifizierungszone, die unter anderem der Verbindung mit dem Knochen dient (Benz & Mollenhauer, 2007, S. 253; Buckwalter et al., 2005, S. 465-80). Kleinere Verletzungen der Tangentialzone können durch ein Übergewicht an katabolen Prozessen gegenüber der metabolischen und enzymatischen anabolen Reaktion zu einem Übergang des Defekts in tiefere Schichten resultieren (Franz et al., 2001, S. 582; Hunziker, 2002, S. 433). Reicht der Defekt bis zum subchondralen Knochen, kann ein endogener Reparaturmechanismus erfolgen. Das so entstandene fibrokartilaginäre Gewebe ist dem hyalinen Knorpel jedoch nicht ebenbürtig (D. Frisbie et al., 2003, S. 219). Durch die Freilegung des subchondralen Knochens entsteht ein Blutpfropf, der den Defekt füllt. Hier hinein setzen sich unter anderem mesenchymale Stammzellen, Lipide und Proteine (Alford & Cole, 2005, S. 445; Hunziker, 2002, S. 433). Die Heilungskapazität ist jedoch in Bezug auf die Defektgröße begrenzt und das Reparaturgewebe kann nicht die gleiche Qualität wie hyaliner Knorpel erreichen (Erggelet & Vavken, 2016, S. 150; Knutsen et al., 2004, S. 462).

Die Ausbildung des Regeneratgewebes durchläuft aufeinanderfolgende Phasen. In der Proliferationsphase, die bis zu 6 Wochen dauert, entsteht zunächst eine fluide Defektfüllung. In der Transitionsphase wird bis zur 12. Woche die Matrix durch Kollagen- und Proteoglykansynthese ausgebildet und die Chondrozyten differenzieren sich. Nach 3-6 Monaten entsteht in der Remodulationsphase eine zunehmend belastbare, gut integrierte Defektfüllung die anschließend in eine 2-3 Jahre dauernde Reifungsphase mündet (Hambly et al., 2006, S. 1022; Hirschmuller et al., 2011, S. 2687).

## 1.2. Therapie osteochondraler Defekte im Kniegelenk

Da osteochondrale Schädigungen und die daraus resultierende Arthrose noch immer zu den dominierenden Erkrankungen in den Industrienationen (Glyn-Jones et al., 2015, S. 376) gehören und die wirtschaftliche Belastung der Erkrankung mit ca. 1-2,5 % des Bruttoinlandsprodukts in westlichen Industrienationen beachtlich ist (Hiligsmann et al., 2013, S. 305), ist eine suffiziente Therapie eminent wichtig.

Osteochondrale Defekte betreffen sowohl Knochen- als auch Knorpelgewebe. Aus diesem Grund muss die unterschiedliche intrinsische Regenerationskapazität der beiden Gewebe bei der Therapie berücksichtigt werden (Kon et al., 2010, S. 301).

Bei der autologen osteochondralen Transplantation wird ein Knorpelknochenzylinder aus einem minderbelasteten Bereich des Kniegelenks, z.B. aus der proximolateralen Trochlea entnommen und im gleichen Eingriff in die vorbehandelte Defektstelle passgenau eingesetzt. Somit werden beide Gewebearten – Knorpel und Knochen – im Defektbereich ersetzt und die behandelte Defektstelle hat eine Oberfläche aus hyalinem Knorpel. Nach Einwachsen des Zylinders kann eine schnellere Belastung erfolgen. Die Verwendung von mehreren Zylindern in einem Knie ist möglich, die zu behandelnde Defektgröße jedoch nicht unbegrenzt (Hangody et al., 1997, S. 264-5). Als weitere Nachteile dieser Technik sind der zusätzliche Defekt an der Entnahmestelle, eine Begrenzung des Patientenalters und eine unzureichende Randintegration zu nennen (Gupta et al., 2010, S. 18-9).

Mit der Matrixgestützten Autologen Chondrozyten-Transplantation (MACT) können auch größere osteochondrale Läsionen therapiert werden (Vogt et al., 2007, S. 502). Hierbei werden inzwischen, in Anlehnung an die ursprünglich von Brittberg et. al (1994, S. 890-4) entwickelten Technik, zunächst Chondrozyten aus einem minderbelasteten Gelenkbereich entnommen, mittels *Tissue Engineering* auf einem biologischem Trägermaterial (Matrix) *in vitro* kultiviert und anschließend reimplantiert (Welch et al., 2016, S. 85). War für die Implantation der Chondrozyten zu Beginn noch eine offene Operation via Arthrotomie von Nöten, sind heutzutage voll arthroskopische Verfahren möglich (Schlumberger et al., 2020). Nach Implantation bilden die Chondrozyten ein hyalin-ähnliches Gewebe aus.

Für die MACT, wies Andriolo et al. (2020, S. 2999) eine anhaltende signifikante Verbesserung des klinischen Befundes bis zu 15 Jahre nach der Operation nach. Diese

Ergebnisse konnten durch weitere Studien bestätigt werden (Gille et al., 2016, S. 309; Kreuz et al., 2019, S. 305).

Da Chondrozyten in der Matrix nur langsam wachsen, eine Tendenz zu Dedifferenzierung haben und der Aufbau des hyalinen Knorpels Chondrozyten mit unterschiedlichen Eigenschaften in den unterschiedlichen Zonen (siehe Abb. 1) vorsieht (Schulze-Tanzil, 2009, S. 334), liegt die Hoffnung des *Tissue Engineering* in einer Weiterentwicklung der Knorpeltherapie durch die Verwendung mesenchymaler Stammzellen (MSC) anstelle von Chondrozyten.

### **1.3. Mesenchymale Stammzellen in der Therapie osteochondraler Defekte**

Mesenchymale Stammzellen haben sowohl chondrogenes und als auch osteogenes Potential (Richter, 2005, S. 250). Durch Differenzierung zu Knochen- und Knorpelgewebe kann, im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Verfahren, eine natürlichere Defektfüllung erreicht werden. MSC können aus Knochenmark (*bone marrow* MSC, BMSC), Fettgewebe (*adipose derived* SC, ASC), peripherem Blut (*peripheral blood* SC, PBSC) und aus Nabelschnurblut gewonnen werden (Gobbi et al., 2015, S. 82; Jo et al., 2014, S. 1254; Marmotti et al., 2014, S. 20; Saw et al., 2013, S. 684). Eine allogene Transplantation von MSC ist aufgrund ihrer geringen Expression von antigen-präsentierenden Molekülen möglich (Prockop, 2009, S. 939-41).

Afizah et al. (2007, S. 659) haben sowohl *in vitro* als auch *in vivo* für BMSC im Vergleich zu ASC ein höheres chondrogenes Potential nachgewiesen. Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch Hui et al. (2005, S. 904). Andere Studien zeigten jedoch vergleichbare Ergebnisse zwischen BMSC und ASC (Strioga et al., 2012, S. 2724). In der klinischen Anwendung werden MSC unter anderem mittels Injektion in ein betroffenes Gelenk eingebracht. Diese Methode konnte in einer Metaanalyse als sicher, jedoch nicht als sicher wirksam eingestuft werden (Xing et al., 2018, S. 1406-8). Dagegen konnten Gobbi & Whyte (2019, S. 1621) über gute bis exzellente Ergebnisse 6 Jahre nach Implantation von BMSC in osteochondrale Defekte berichten. Im Vergleich zur ACT konnte keine Unterlegenheit der Therapie mit BMSC über 2 Jahre gezeigt werden (Nejadnik et al., 2010, S. 1110).

Im Fokus der aktuellen Forschung steht die Frage, ob die Hauptwirkung der Therapie in der Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit der Stammzellen oder in deren Freisetzung von Wachstumsfaktoren, Immunmodulatoren und Proteinen liegt. Denn so

scheinen MSC vorhandene Chondrozyten zur Proliferation und Matrixsynthese anzuregen (Lai et al., 2013, S. 1; Zhang et al., 2018, S. 16). Verschiedene Studien demonstrierten den gegenseitigen Einfluss von MSC und Chondrozyten aufeinander, die als Mischkultur kultiviert wurden (Mo et al., 2009, S. 42; Tsuchiya et al., 2004, S. 391).

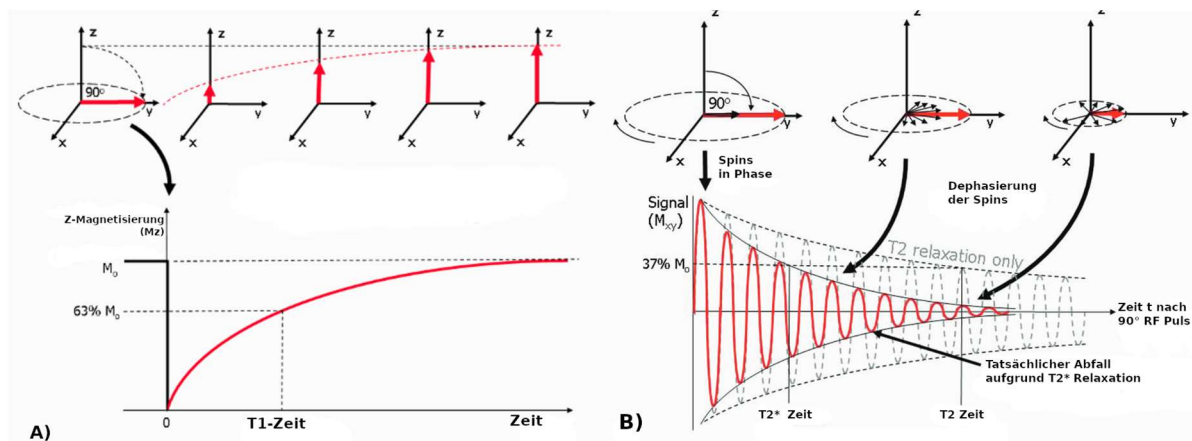
Da die genauen Wechselwirkungen zwischen Chondrozyten und MSC noch unklar sind, und eine direkte Übertragung der *in vitro* Studien auf *die in vivo* Anwendung aufgrund der Heterogenität der verwendeten Protokolle bei Isolierung und Kultivierung der Zellen sowie des veränderten Milieus *in vivo* unmöglich ist (Augello & De Bari, 2010, S. 1234; Bornes et al., 2014, S. 446-7), ist die Etablierung einer Methode des *in vivo* Monitorings implantierter Zellen von zentraler Bedeutung.

#### **1.4. Prinzip der Magnetresonanztomografie**

Die MRT ist aktuell das bildgebende Verfahren der Wahl im klinischen Alltag zur Beurteilung von Knorpel und subchondralem Knochen (Ronga et al., 2014, S. 137).

Jedes Atom erzeugt durch seinen Eigendrehimpuls (Spin) des Atomkerns ein Magnetfeld. Das Magnetfeld eines einzelnen Atoms im Körper ist zu klein, um es von außen zu messen. Es ist jedoch möglich, durch externe Magnetfelder mit der Gesamtmenge der Magnetfelder der Atomkerne in Wechselwirkung zu treten. Für die MRT macht man sich die günstigen Dipoleigenschaften des Wasserstoffes, sowie sein Vorkommen in großer Menge im menschlichen Körper zu Nutze. Die Rotationsachsen der Kerne werden durch ein extern angelegtes statisches Magnetfeld mit der Feldstärke  $B_0$  ausgerichtet, wobei die Kerne eine kreisförmige Ausgleichbewegung entlang ihrer Längsachse vollführen. Diese wird Präzessionsbewegung genannt und hat eine spezifische Frequenz, die Larmor-Frequenz, die durch die Elementart und die Feldstärke bestimmt wird (Schick, 2005, S. 70-1). Gängige, in der Klinik verwendete Feldstärken  $B_0$ , sind 1,5 und 3 Tesla (T), es gibt aber schon kommerziell verfügbare Ganzkörperscanner mit 7T, deren Anzahl erwartungsgemäß steigen wird (Kraff & Quick, 2019, S. 900-1). Um nun ein Signal zu generieren wird ein Hochfrequenz (HF)-Impuls mit der spezifischen Larmor-Frequenz für Wasserstoffatome in der verwendeten Feldstärke von außen angelegt, der den Längsmagnetisierungsvektor  $M_0$  der Kerne in eine Quermagnetisierung  $M_{xy}$  auslenkt. Über die Wahl von Dauer und Amplitude des HF-Impuls kann man den Auslenkungswinkel steuern. Diese Quermagnetisierung kann mittels der Empfänger-Spule gemessen werden. Über den Einsatz von Gradientenfeldern und anschließender

Fournier-Transformation kann aus den gemessenen Signalen ein digitales Bild kreiert werden (Ridgway, 2010, S. 2-11). Nach Beendigung des HF-Impulses kehren die Kerne wieder in die Ausgangslage zurück. Somit ändert sich auch die Magnetisierung von  $M_{xy}$  zurück zu  $M_0$ . Diesen Prozess nennt man T1-Relaxation oder Spin-Gitter-Relaxation. Die dafür benötigte T1-Zeit ist gewebe- und feldstärkenabhängig. Da jedes einzelne Proton für sich genommen als magnetischer Dipol anzusehen ist, bestehen auch Wechselwirkungen der Wasserstoffkerne untereinander, die zu einer Dephasierung der Kernspinbewegungen und zur Abnahme der Quermagnetisierung führen. Dies wird als T2- oder Spin-Spin-Relaxation bezeichnet. Die Zeit, bis die ursprüngliche Quermagnetisierung auf 37 % abgefallen ist, wird als T2-Zeit bezeichnet und ist gewebeabhängig. Da auch Inhomogenitäten des Magnetfeldes  $B_0$  sowie der Patient selbst Einfluss auf die gemessene T2-Zeit haben, ist die tatsächlich beobachtete Zeit kürzer und wird als T2\* beschrieben (Ridgway, 2010, S. 4-5). Die Unterscheidung zwischen T2-Relaxation und T2\*-Relaxation ist jedoch eminent wichtig, da sie generell auch unterschiedliche Aufnahmesequenzen erfordert. Wird die T2-Zeit mit einer auf Carr-Purcell-Meiboom-Gill basierenden Spin-Echo Sequenz gemessen, so werden für die T2\*-Relaxation Gradienten-Echo-Sequenzen verwendet (Robson et al., 2003, S. 829).



**Abbildung 2: T1-Relaxation (A) sowie T2- und T2\*-Relaxation (B), (Ridgway, 2010)**

A) Erholung der Längsmagnetisierung  $M_z$  nach einem  $90^\circ$  HF-Puls; B) T2 und T2\* Relaxation nach einem  $90^\circ$  HF-Puls. Die Amplitude nimmt durch die Dephasierung der Protonen ab

Gängige Untersuchungssequenzen für die Beurteilung von Knorpelgewebe sind T2-gewichtete Spin-Echo (SE), Fast-Spin-Echo (FSE) und multi-echo SE Sequenzen und daraus generierte Karten (*maps*) (Pai et al., 2008, S. 1220), T2\*-gewichtete Gradienten Echo Sequenzen (GRE) (Bittersohl et al., 2009, S. 900), Protodichte gewichtete fettsupprimierte-Sequenzen (Sonin et al., 2001, S. 1162-3) und dGEMRIC (*delayed*

*gadolinium-enhanced MRI of cartilage*), eine T1 gewichtete Untersuchung, die auf der Abstoßung der Glykosaminoglykane des Knorpels und eines injizierten Gadolinium KM basiert (Bashir et al., 1997, S. 556-7).

## **1.5. Kontrastmittelgestützte zelluläre MRT**

In den benannten MRT-Sequenzen werden das Knorpel- oder Regenerationsgewebe im Gesamten, jedoch nicht die einzelnen, zellulären Vorgänge beurteilt. Um die Regenerationsprozesse besser zu verstehen, um Therapien optimieren zu können und Therapieversager frühzeitig zu erkennen ist die Darstellung auf zellulärer Ebene *in vivo* nötig. Die kontrastmittelgestützte zelluläre MRT ist aufgrund der fehlenden Strahlenbelastung, des hohen Weichteilkontrast und der hohen Ortsauflösung der Zelldarstellung durch Positronen-Emissions-Tomografie (PET) (Elhami et al., 2011, S. 1323), Single Photon Emissions Computer Tomografie (SPECT) (Bindslev et al., 2006, S. 1171), Biolumineszenz Bildgebung (Hsieh et al., 2006, S. 1663), Fluoreszenzbildgebung (Boddington et al., 2008, S. 1) und der Computertomografie (Betzer et al., 2014, S. 9282) überlegen (Bulte & Kraitchman, 2004, S. 314-6; Rumenapp et al., 2012, S. 1166). Durch die zelluläre MRT ist es möglich, durch repetitive Untersuchungen das Verhalten der implantierten Zellen zu beobachten und möglicherweise auch eine Migration von Zellen zu visualisieren. Zur sicheren Detektion müssen die MSC mit einem Kontrastmittel (KM) markiert werden. Kontrastmittel unterscheiden sich hinsichtlich ihres Einflusses auf die Bildgebung und in ihrer Biokompatibilität. Zu den die T1-Zeit beeinflussenden KM werden die paramagnetischen, auf Gadolinium basierenden Substanzen gezählt. Dem gegenüber stehen superpara-magnetische Eisenoxide (SPIO) mit maßgeblichem Einfluss auf die T2- und T2\*-Relaxation (Li et al., 2013, S. 596). Als Vorteile der SPIO werden eine höhere Änderung der Signalintensität pro Partikel, die gute Biokompatibilität sowie die Möglichkeit einer lichtmikroskopischen Darstellung gesehen, um so unter anderem auch einen Vergleich zwischen den Ergebnissen der MRT Bildgebung und der histologischen Untersuchung ziehen zu können (Bulte & Kraitchman, 2004, S. 485). In der Literatur sind zahlreiche Methoden zur Markierung von MSC mit SPIO beschrieben. (Ittrich et al., 2005, S. 1151; Yang et al., 2011, S. 447-8). Das für die klinische Anwendung in Europa und Japan zugelassene Ferucarbotran (Resovist®) zeigt im Vergleich zu anderen SPIO bei adäquaten Konzentrationen keinen negativen Einfluss auf die Differenzierungsfähigkeit der MSC (Henning et al., 2009a, S. 171). Zudem wurde es bereits in multiplen Studien erfolgreich



zur Zellmarkierung von humanen MSC ohne Verwendung von Transfektionsvektoren eingesetzt (Boutry et al., 2008, S. 223; Golovko et al., 2010, S. 641). Arbab et al. (2005, S. 388-9) zeigten, dass zunächst inkooperierte SPIO nach Zell-Lyse zu freiem Fe<sup>3+</sup> zersetzt wurden und zu einer Veränderung der Signalintensität führten. Hierdurch könnte ein Zelluntergang markierter MSC nach Implantation früher detektiert werden. Ein unterschiedlicher Einfluss auf die Signalintensität von vitalen, SPIO-markierten MSC im Gegensatz zu lysierten Zellen konnte auch in anderen Studien belegt werden (Daldrup-Link, 2017, S. 621).

## **1.6. Ziel der Arbeit**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, ob und über welchen Zeitraum Resovist<sup>®</sup>-markierte Zellen in unterschiedlichen MRT-Sequenzen detektierbar sind, die Resovist<sup>®</sup>-Markierung die Regeneratbildung beeinflusst und sich Unterschiede in der Defektheilung im Vergleich zu nicht markierten Zellen zeigen.

Zudem wurde der Einfluss der Operation und der Zellmarkierung auf den umgebenden Knochen, den postoperativen Gelenkerguss und die Synovialmembran MR-tomografisch untersucht.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Material**

#### **2.1.1. Tiermodell**

Für die Durchführung der Arbeit wurden 40 adulte Kaninchen der Rasse „New Zealand White Rabbits“ (NZW) verwendet. Die Tiere stammten aus der Tierzucht Charles River, Frankreich (Saint Germain sur l'Arbresle, France). Vor Beginn der Studie wurde ein Tierversuchsantrag (Aktenzeichen 55.2.1.43-2532-105-11) an die Regierung von Oberbayern gestellt und genehmigt.

Bei Anlieferung in das Zentrum für präklinische Forschung im Klinikum rechts der Isar München wurden die Tiere tierärztlich untersucht und gewogen. Anschließend erfolgte eine mindestens einwöchige Eingewöhnungsphase an die neue Umgebung. Die EU-Richtlinie 86/609 zum Schutz von Versuchstieren innerhalb der Europäischen Union wurde eingehalten.

Während des Studienzeitraums wurden die Kaninchen in Tierhaltungsräumen mit Einzelkäfigen von 60 cm x 60 cm x 60 cm Größe gehalten. In den Räumen gab es automatisierte Lichtprogramme (Hell/Dunkelprogramme mit Dämmerlicht) und angepasste Raumluft- und Temperaturregulation. Die Durchführung von Fütterung und Käfigreinigung erfolgte durch ausgebildete Tierpfleger. Als Nahrung gab es Heu und artgerechte Tiernahrung in pelletierter Form *ad libitum*. Ungesäuertes Leitungswasser wurde zur Verfügung gestellt und zweitäglich gewechselt.

Im weiteren Verlauf erfolgten Körpergewichtsbestimmungen direkt vor der Implantation sowie die ersten 3 Tage postoperativ. Ebenso erfolgte die Bestimmung des Körpergewichts vor jeder Analgesiedierung zu den MRT Untersuchungen, um eine körpergewichts adaptierte Medikation zu gewährleisten. Der Gesundheitszustand wurde durch eine Beurteilungsskala schriftlich dokumentiert (siehe Anhang 1). Es wurden vor Studienbeginn die Abbruchkriterien Gelenkinfektion, Gewichtsabnahme von mehr als 15 %, Nahtdehiszenz und Lahmheit definiert. Bei Eintreten eines dieser Kriterien wäre das Versuchstier schmerzfrei euthanasiert worden.

### **2.1.2. Zellen**

Die mesenchymalen Stammzellen wurden nach der von Berninger et al. (2013b, S. 2-3) beschriebenen Methode aus einem 4 Monate alten NZW Kaninchen gewonnen. Nach Narkotisierung mit Propofol und Euthanasie des Spendertiers mit Pentobarbital wurde die Tibia und Fibula eröffnet und das Knochenmark mit 10 ml *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) Medium ausgeschwemmt und in Suspension gebracht. Anschließend wurde die Suspension filtriert und bei 500 x G für 5 min zentrifugiert. Die so gewonnenen Zellen wurden mit 10ml DMEM und 1 % Penicillin-Streptomycin gemischt. Von der Suspension wurden 5ml mit 5 ml *Biocoll Separating Solution* gemischt und für 20min bei 800 x G und Raumtemperatur zentrifugiert. Die zellreiche Zwischenschicht, von der sich die roten Blutkörperchen abgesetzt haben, wurde vorsichtig entnommen und mit 5 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Dieser Vorgang wurde 3-mal wiederholt. Die Zellen wurden nach erneuter Zentrifugation bei 350 x G mit einer Aussaatdichte von ca.  $5 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> in dem Komplettmedium *Advanced DMEM* + 10 % fetalem Kälberserum und 1 % Penicillin-Streptomycin kultiviert. Nicht-adhärenente Zellen wurden nach 2-3 Tagen beim Wechsel des Mediums entfernt. Die erste Passage wurde nach 5-10 Tagen vollzogen. Die Transduktion mit dem fluoreszierenden Protein eGFP erfolgte bei Passage 2-5 (s. 2.2.2.).

### **2.1.3. Kontrastmittel Ferucarbotran (Resovist®)**

Das in dieser Studie verwendete Kontrastmittel Ferucarbotran (Resovist®, Schering AG, Berlin, Deutschland) ist ein SPIO mit einem Kern aus einzelnen Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> und Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Kristallen umhüllt von Carboxydextran. In der Photonenkorrelationsspektroskopie liegt der hydrodynamische Durchmesser bei 62 nm. Resovist® enthält 0,5molFe/l (Reimer & Balzer, 2003, S. 1267). Die Relaxivität für r<sub>2</sub> 151,0 und 25,4 mM<sup>-1</sup>sec<sup>-1</sup> für r<sub>1</sub>. Daher ist der Einfluss auf die T<sub>2</sub>/T<sub>2</sub>\*-Zeit deutlich stärker als auf die T<sub>1</sub>-Zeit (Wang, 2011, S.36). Ferucarbotran wird durch Endozytose in Zellen aufgenommen und in Lysosomen gespeichert (Metz et al., 2004, S. 1854). Aufgrund des Eisenkerns ist Ferucarbotran mittels Berliner Blau Färbung lichtmikroskopisch darstellbar (Lunov et al., 2010, S. 9018).

## 2.1.4. Verbrauchsmaterial /Chemikalien

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
Advanced DMEM	Life Technologies (Bleiswijk, NL)
Biocoll Seperating Solution	Biochrom GmbH (Berlin, D)
DMEM	Biochrom GmbH (Berlin, D)
Einmalhandschuhe	Semperit GmbH &Co KG (Wien, AUT)
Einmalinjektionskanülen Sterican®	B. Braun (Melsungen, D)
Einmal Op-Mantel Sentinex®	Lohnmann&Rauscher (Rengsdorf, D)
Einmalspritzen 2ml, 5ml, 10ml	B. Braun (Melsungen, D)
Endotracheal Tubus 2,5mm	Rüsch (Kernen, D)
Fetales Kalbsserum (FCS)	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach,D)
Infusionsbesteck	B. Braun (Melsungen, D)
Infusomat® Leitung	B. Braun (Melsungen, D)
Keramik Bohrer 3,5mm	Maxodontal (Sexau, D)
Kompressen Gazin®	Lohnmann & Rauscher (Rengsdorf, D)
Leukoplast®	BSN Medical (Hamburg,D)
Monocryl® 4-0	Ethicon (Norderstedt, D)
Ohrstöpsel Ear Classic 2	3M Peltor (Neuss, D)
Perfusorspritze 50ml	B. Braun (Melsungen, D)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, D)
Phosphatgepufferter Salzlösung	Biochrom GmbH (Berlin, D)
Skalpell No. 22 + No. 15	Feather (Seki, J)
Tissucol Duo® S 0,5ml Immuno	Baxter (Unterschleißheim, D)
Trypan Blau Solution (0,4%)	Sigma-Aldrich (München, D)
Vasofix® Braunülen 22G 25mm	B. Braun (Melsungen, D)
Vicryl® 4-0	Ethicon (Norderstedt, D)
Zentrifugenröhrchen 50ml	TPP AG (Trasadingen, CH)

### 2.1.5. Medikamente

Handelsname	Wirkstoff	Hersteller
Antisedan®	Atipamezol	Orion Corporation, (Espoo, FIN)
Bepanthen®	Dexpanthenol	Bayer (Leverkusen, D)
Buprenovet®	Buprenorphin	Bayer (Leverkusen, D)
Cutasept® F	Alk. Antiseptikum	Bode Chemie (Hamburg, D)
Domitor®	Medetomidin	Orion Corporation, (Espoo, FIN)
Emla®	Lidocain & Prilocain	AstraZeneca (London, UK)
Eutadorm®	Natriumpentobarbital	CP-Pharma (Burgdorf, D)
Fentadon®	Fentanylcitrat	Pfizer (Berlin, Deutschland)
Ketamin	Ketamin	CP-Pharma (Burgdorf, D)
Narcofol®	Propofol 1%	CP-Pharma (Burgdorf, D)
Natrium-Chlorid 0,9%	Natriumchlorid (0,9%)	B. Braun (Melsungen, D)
Propofol-Lipuro®	Propofol 2%	B. Braun (Melsungen, D)
Rimadyl®	Carprofen	Pfizer (Berlin, Deutschland)

### 2.1.6. Geräte

Gerät	Hersteller
Anesthesia Workstation	Hallowell EMc (Pittsfield, USA)
dStream small extremity 8ch coil	Philips Healthcare (Hamburg, D)
Luftdruck Bohrmaschine	Aesculap (Tuttlingen, Deutschland)
Megafuge 2.0 R Zentrifuge	Heraeus Instruments (Hanau, D)
MRT Ingenia 3,0 T	Philips Healthcare (Hamburg, D)
PEN E-P5	Olympus (Nikkei, Japan)
Perfusor Secura FT	B. Braun (Melsungen, D)
Pulsoxymeter 8600V	Nonin (Plymouth, USA)
S5 Intensiv-Monitor	Datex Ohmeda (Duisburg, D)

### 2.1.7. Software

Software	Hersteller
EndNote® X9	Clarivate Analytics (Philadelphia,USA)
Impax® EE	Agfa Healthcare (Mortsel, B)
Microsoft® Excel®	Microsoft (Redmond, USA)
Microsoft® Word®	Microsoft (Redmond, USA)
OsiriX® lite	Pixmeo Sàrl (Bernex, CH)
RadiAnt® DICOM Viewer	Medixant (Poznan, PL)
SPSS®	IBM (Ehningen, Deutschland)

### 2.1.8. Fibrinkleber

Zur Fixierung der Zellimplantate in den osteochondralen Defekten wurde der Zwei-Komponenten Kleber Tissucol duo® S 0,5 ml Immuno (Fa. Baxter) verwendet. Dieser besteht aus zwei Fertigspritzen mit je 0,5 ml Lösung. Die eine enthält eine Lösung aus Humanplasmaproteinfraktion, Fibrinogen, Aprotinin (bovin), Plasmafibronectin und Blutgerinnungsfaktor XIII , die andere eine Thrombinlösung. Beide Komponenten vermischen sich beim Herausdrücken aus den Spritzen und erlauben eine Fixierung des Implantates innerhalb von wenigen Sekunden.

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Studiendesign

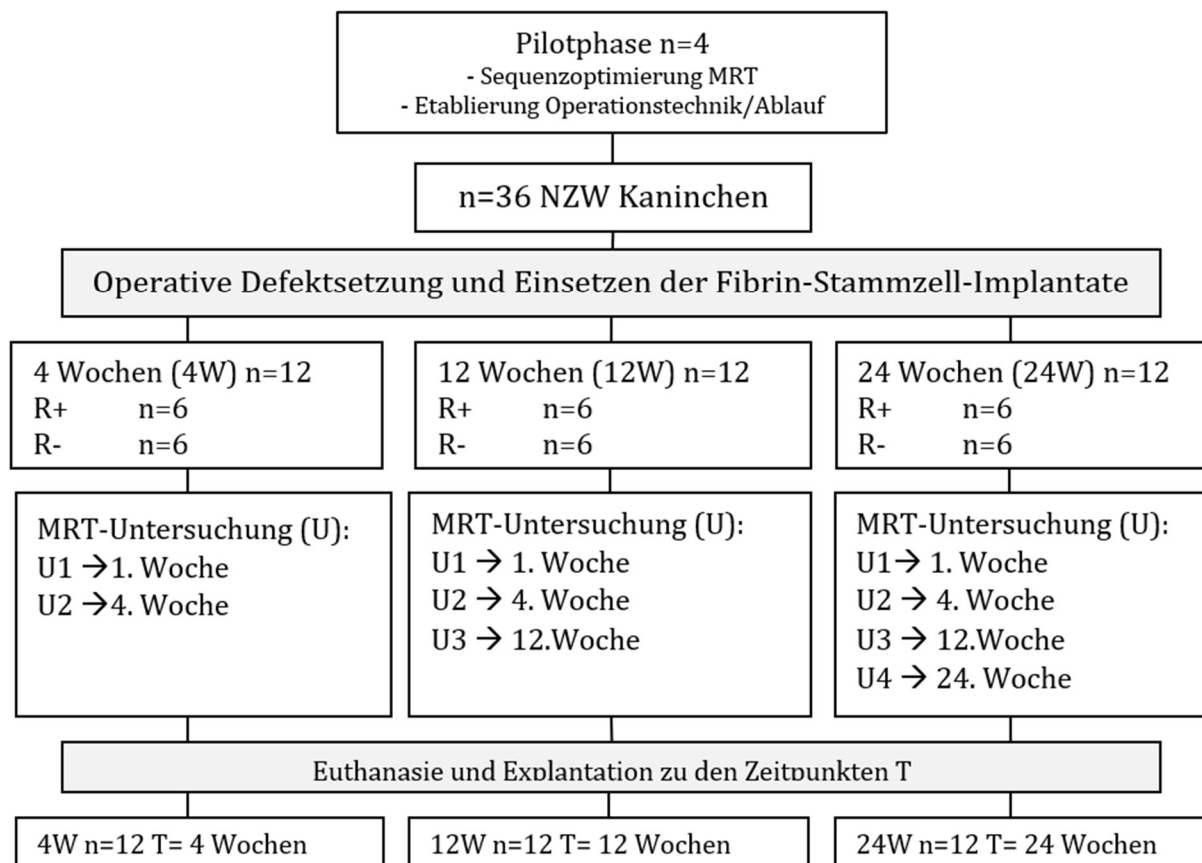
In Abbildung 3 ist der Studienaufbau im zeitlichen Ablauf schematisch dargestellt.

Vor Beginn der eigentlichen Versuchsreihe erfolgte zunächst eine vierwöchige Pilotphase mit vier Tieren zur Optimierung der MRT-Sequenzen.

Die Herkunft der *bone marrow derived stem cells* (BMSC) wurde in 2.1.2. beschrieben. Zuerst wurden alle BMSC nach dem in 2.2.2. beschriebenen Verfahren mit dem fluoreszierenden Protein (eGFP, *enhanced Green Fluorescent Protein*) lentiviral transduziert, anschließend wurden die Hälfte (n=18) mit Resovist® gelabelt. Nach Fixierung der MSC in den Fibrin-Implantaten entstanden so 18 Resovist®-markierte (R+) und 18 Resovist®-unmarkierte (R-) Implantate

Die 36 NZW Kaninchen wurden in drei Gruppen (4W, 12W und 24W) von jeweils 12 Tieren eingeteilt. In jeder der drei Gruppen wurden in jeweils sechs Tieren je zwei *in vitro* hergestellte R+ Fibrin-Implantate von 3,5 mm Durchmesser in standardisierte Defekte in der Trochlea des linken Kniegelenks implantiert. Den anderen sechs Tieren wurden je 2 R- Fibrin-Implantate in gleichartige Defekte implantiert.

In der ersten Gruppe wurden nach 1 und nach 4 Wochen *post implantationem* die MRT Untersuchungen (U1 und U2) durchgeführt. Anschließend erfolgte die Euthanasie der Tiere und die Explantation der linken Kniegelenke für weitere histologische und molekularbiologische Untersuchungen. Nach gleichem Prinzip wurden in der 12W-Gruppe zu den Zeitpunkten 1 Woche (U1), 4 Wochen (U2) und 12 Wochen (U3), sowie in der 24W-Gruppe zu den Zeitpunkten 1 Woche (U1), 4 Wochen (U2), 12 Wochen (U3) und 24 Wochen (U4) die MRT Untersuchungen durchgeführt. Die Euthanasie der Versuchstiere und die Entnahme der Kniegelenke erfolgte dementsprechend nach 12 bzw. 24 Wochen. Die histologischen und molekularbiologischen Untersuchungen waren nicht Teil der vorliegenden Arbeit und erfolgten in einer gesonderten Arbeit. In den MRT-Untersuchung wurden zu jedem Untersuchungszeitpunkt T1-gewichtete, Protonendichte-gewichtete, T2-gewichtete und T2\*-gewichtete Sequenzen generiert.



**Abbildung 3: Studiendesign**

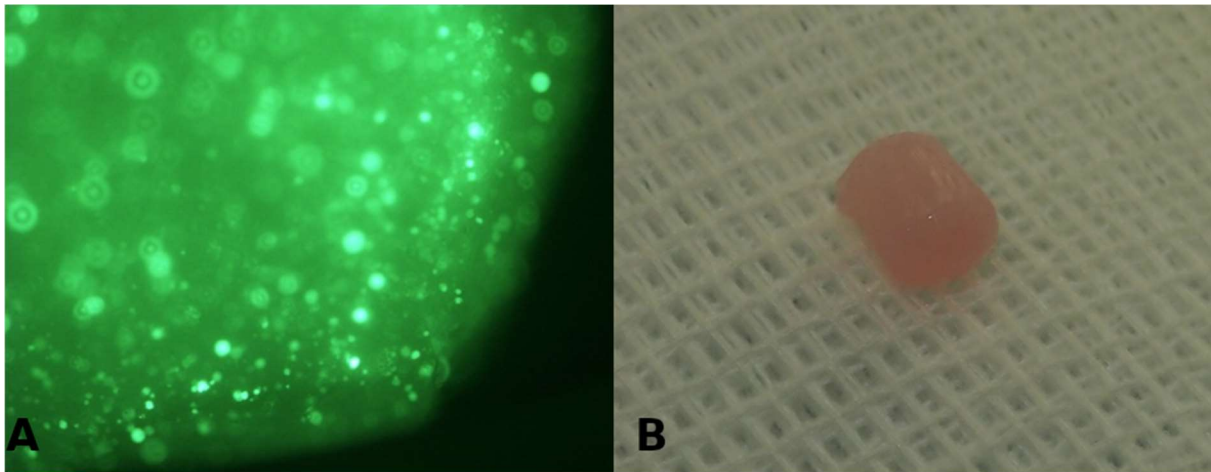
n= Anzahl, T=Zeitpunkt, W=Wochen, R+=Resovist®-markiert, R-=Resovist®-unmarkiert, U=Untersuchung

### 2.2.2. Stammzell-Fibrin-Implantate

Die Herstellung der zu implantierenden Stammzell-Fibrin-Implantate war nicht Teil dieser Arbeit und wurde parallel zu den Versuchen gemäß dem Protokoll von Berninger et al. (2019, S. 3-8 ESM; Berninger et al., 2013b, S. 3-8) angefertigt. Kurz zusammengefasst wurden die mesenchymalen Zellen mit einem *enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP) markiert, um in den *in vivo*-Versuchen die markierten MSC von nativen, nicht implantierten Zellen immunhistologisch zu unterscheiden und eine Kontrollgruppe für die Resovist®-markierten MSC zu schaffen. Zudem konnte so die gleichmäßige Verteilung der Stammzellen in den Fibrinimplantaten vor Implantation überprüft werden (Berninger et al., 2019, S. 4 ESM). In eine sterile Kunststoffplatte wurden Löcher von 3,6 mm Durchmesser und 3 mm Tiefe als Gussform gebohrt, die den späteren Defekten entsprachen. In diesen Löchern wurden die eGFP-lentiviral-transduzierten MSC zusammen mit Thrombin und Fibrinogen zu Fibrin-Stammzell-Implantaten gegossen und



ausgehärtet. Die Hälfte der Implantate enthielten MSC, die zusätzlich nach der von Henning et al. (2009a, S. 167) beschriebenen Methode mit Resovist® markiert wurden.



**Abbildung 4: Fertiges Fibrin-Stammzell-Implantat**

A) Fluoreszenz Aufnahme eines ausgehärteten Fibrin-Stammzell-Implantat vor Implantation (Berninger 2013);

B) Fibrin-Stammzell-Implantat vor Implantation

### **2.2.3. Operative Eingriffe**

Für die Durchführung des Versuches wurden die Kaninchen einem operativen Eingriff unterzogen. Dieser wurde im Zentrum für präklinische Forschung im Klinikum rechts der Isar durchgeführt.

#### **2.2.3.1. Anästhesie**

Die Einleitung der Anästhesie und deren intraoperative Überwachung wurde durch erfahrene Tierärzte durchgeführt. Zu Beginn erfolgte eine Tiermedizinische Untersuchung inklusive der Bestimmung des aktuellen Körpergewichts. Anschließend wurde dem Versuchstier eine Venenverweilkanüle 22G an beiden Ohren in jeweils eine Ohrtrandvene gelegt. Hierrüber erfolgte die Einleitung der Narkose mit Narcofol® in der Dosierung 10 mg/kg Körpergewicht (kgKG). Zur Überprüfung der Narkosetiefe wurden der Liedrandreflex, die Atmung sowie der Muskeltonus überwacht. Anschließend wurde das Tier in Rückenlage positioniert und mit 2,5 mm Tuben endotracheal intubiert. Zur leichteren Intubation wurde der Kopf des Tieres leicht überstreckt. Zur intraoperativen Oxygenierung erfolgte eine volumengesteuerte Beatmung mit 100 %igem Sauerstoff, einem Atemminutenvolumen (AMV) von 6.8 ml/kgKG und einer Atemfrequenz von 25-

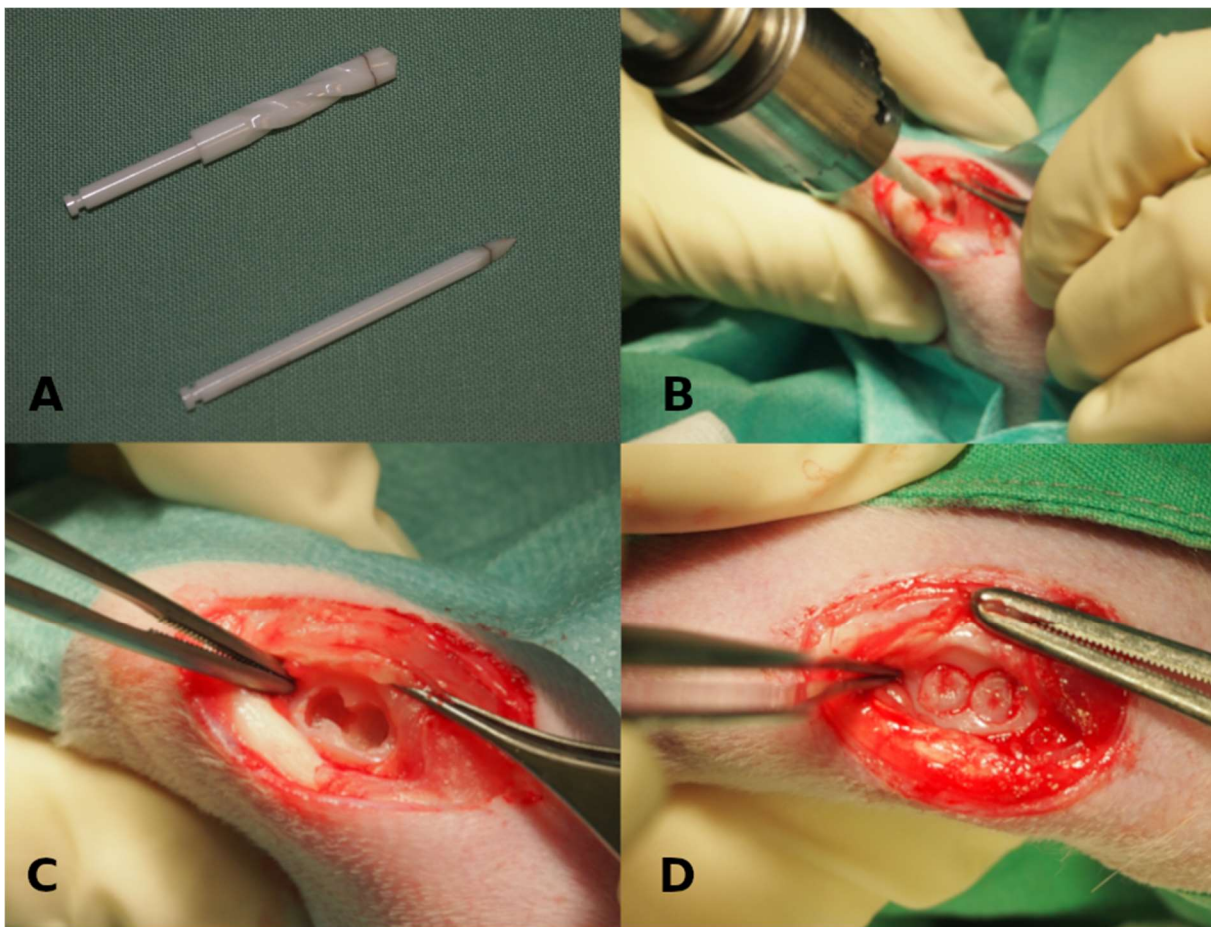
35 /Minute. Mittels eines Perfusors wurde die Narkose mit 2 %igem Propofol gewichtsadaptiert aufrecht gehalten. Die Überwachung der Versuchstiere erfolgte durch Kapnometrie und Pulsoxymetrie. Die Schmerzfreiheit wurde intraoperativ über Fentanyl-Bolusinjektionen (0,05 mg/kgKG) nach Bedarf gewährleistet. Nach Nahtende wurde die Anästhetikagabe eingestellt und das AMV langsam reduziert. Bei Erreichen einer Spontanatmung mit ausreichender Sauerstoffsättigung konnten die Kaninchen extubiert werden. Noch im Operationssaal bekamen die Tiere gewichtsadaptiert Buprenorphin (0,025 mg/kgKG) und Rimadyl® (10 mg/kgKG) subcutan (s.c.) zur postoperativen Schmerztherapie. In den ersten drei postoperativen Tagen wurde Buprenorphin 12 stündlich und Rimadyl 24 stündlich in gleicher Dosierung weiter s.c. verabreicht. Gleichzeitig erfolgten Wund- und Körpergewichtskontrollen zunächst alle 12 h mit Dokumentation auf dem in Abschnitt 7 abgebildeten Überwachungsbogen. Nach 3 Tagen erfolgte die Dokumentation wöchentlich. Zudem wurden bei Hinweisen der betreuenden Tierpfleger die Versuchstiere untersucht.

### **2.2.3.2. Implantation**

Für die operative Implantation wurden die Tiere zunächst noch einmal gewogen, um eine gewichtsadaptierte Narkose zu ermöglichen. Nach Einleitung der Narkose wurde das linke Knie mit einer elektrischen Schermaschine vom mittleren Femur bis zum distalen Unterschenkel rasiert. Das geschorene Fell wurde dabei durch einen Staubsauger entfernt. Dies geschah in einem separaten Vorbereitungsraum, um jedwede Kontamination zu vermeiden. Anschließend wurden die Kaninchen im Operationssaal in Rückenlage positioniert, die Augen mit Bepanthen®-Augensalbe geschützt und das Operationsgebiet dreimal steril mit Cutasept® abgewaschen. Dann wurde das Operationsgebiet mit sterilen Stofftüchern abgedeckt.

Zunächst wurde ein circa 1,5 cm langer Hautschnitt medial des Kniegelenks gesetzt. Zuerst erfolgte die Durchtrennung des subkutanen Fettgewebes und der Faszie mit der Schere. Besonders war darauf zu achten oberflächliche Blutgefäße zu schonen. Anschließend erfolgte die Arthrothomie des Kniegelenks von medial mit einem 10er Skalpell, unter Schonung der Kniebinnenstrukturen. Die Patella wurde nun nach lateral luxiert und der Gelenkknorpel auf vorhandene, makroskopisch sichtbare Läsionen überprüft. Jetzt wurden die zwei osteochondralen Defekte in die Trochlea femoris gesetzt. Hierzu wurde das Kniegelenk in 90° Flexion gehalten. Da in dieser Studie die Zellen im

MRT nachuntersucht wurden und es um die Detektion von eisenhaltigen Kontrastmitteln ging, wurden spezielle Keramikbohrer (s. Abb. 5a) verwendet, um Bohrer Abrieb als Fehlerquelle zu eliminieren. Zuerst wurden mit dem Markierungsbohrer zwei Markierungen im Abstand von 3,5 mm gesetzt. Dann wurden die Defekte von 3 mm Tiefe mit dem 3,5 mm Bohrer gebohrt (s. Abb. 5b). Nun wurden die Defekte mehrfach mit NaCl ausgespült, um keine Bohrrückstände im Defekt zu haben. In die Defekte wurde je ein Tropfen Fibrinkleber gegeben und direkt anschließend wurden die Fibrin-Implantate eingesetzt (s. Abb. 5c+d). Dadurch wurden die Implantate in Position fixiert. Es wurden pro Knie jeweils zwei Implantate mit den gleichen Zellen (R+ oder R-) verwendet. Es erfolgte jetzt die Relaxation der Patella und das Knie wurde 10-mal gebeugt und wieder gestreckt. Anschließend erfolgte eine Kontrolle der Lage der Implantate. Nach erneuter Reposition der Patella wurde die Kniegelenkshaut mit 4-0 Vicryl®-Faden in Einzelknopftechnik genäht. Nun erfolgte noch eine adaptierende Fasziennaht ebenfalls mit Vicryl® 4-0 und eine intrakutane Hautnaht mit Monocryl® 4-0.



**Abbildung 5: Operative Implantation der Fibrin-Implantate**

A) Keramik-Bohrer; B) Setzen der osteochondralen Defekte, C) Darstellung der Defekte  
D) Defekte nach Einsetzen der Implantate

## **2.2.4. MRT-Untersuchungen**

Sämtliche MRT Untersuchungen dieser Arbeit wurden am klinischen Philips® Ingenia 3 T MRT am Klinikum rechts der Isar durchgeführt. Das MRT hat eine Feldstärke von 3 Tesla mit einer maximalen Auflösung von 5 µm. Das Gerät verfügt über 8 separate Kanäle zur parallelen Bildgebung. Die maximale Gradientenfeldstärke beträgt 45 mT/m, die maximale Gradientenanstiegszeit ist 200 m/T/s je Achse. Als Spule wurde eine Philips® *dStream small extremity 8ch coil* mit einem Innendurchmesser von 20 cm verwendet, die als Sende- und Empfangsspule arbeitet.

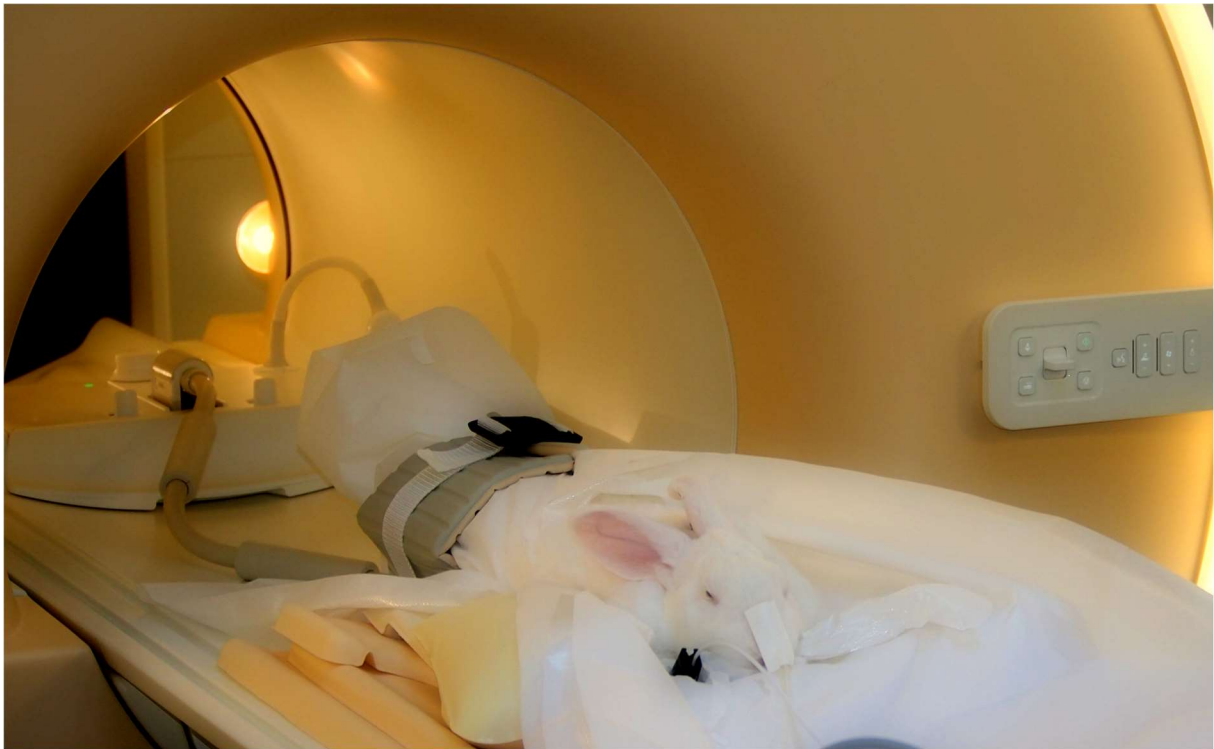
### **2.2.4.1. Anästhesie**

Für der MRT-Untersuchungen wurden die Versuchstiere, nach erneuter Bestimmung des Körpergewichts, einzeln in Transportboxen in den MRT Vorbereitungsraum gebracht. Dort wurde die Analgosedierung mit S-Ketamin 15 mg/kgKG und Medetomidin 0,25 mg/kgKG intramuskulär verabreicht. Die Dosis der Medikamente wurde je zur Hälfte in die Oberschenkelmuskulatur lateral auf beiden Seiten gespritzt.

Anschließend wurden die sedierten Versuchstiere in Bauchlage mit den Hinterläufen Richtung MRT in die *dStream small extremity 8ch coil* gelegt und das zu untersuchende Knie mittig platziert. Als Geräuschschutz wurden Gehörschutzstöpsel in beide Gehörgänge eingeführt. Die Augen wurden mit Bepanthen® Augensalbe versorgt. Unterstützend bekamen die Tiere Sauerstoff 3 l/min über einen vor die Nase geklebten Sauerstoffschlauch. Die Überwachung erfolgte mittels Pulsoxymetrie.

Nach Beendigung der MRT-Untersuchung wurde den Versuchstieren zur Antagonisierung des Medetomidin Antisedan® 0,25 mg/kgKG gespritzt. Nach tierärztlicher Kontrolle der Versuchstiere wurden sie wieder in den Tierhaltungsraum gebracht.

Nach der letzten MRT-Untersuchung (4, 12, oder 24. Wochen) des jeweiligen Tieres wurde den Tieren noch in Analgosedierung zur Euthanasie Pentobarbital 100 mg/kgKG intramuskulär injiziert.



**Abbildung 6: Untersuchungsaufbau im MRT**

Versuchstier im Philips® Ingenia MRT, die MRT Spule wurde um beide Hinterläufe gespannt, das operierte Knie wurde mittig zentriert. Die Überwachung erfolgte mittels SpO<sub>2</sub> Messung.

#### **2.2.4.2. MRT Sequenz-Protokolle und Datenakquisition**

Für jedes Tier wurden zu jedem Messzeitpunkt (1W, 4W, ggf. 12W und 24W) dieselben MRT-Sequenzen akquiriert. Die Gesamtdauer der Untersuchung betrug ca. 39 Minuten.

Die Protokolle der MRT Sequenzen wurden durch Dr. Markus Settles in Zusammenarbeit mit dem betreuendem Radiologen PD Dr. med. Tobias Henning programmiert. Die Durchführung der Untersuchung wurde durch den studienbetreuenden Doktoranden nach vorangegangener Schulung eigenständig durchgeführt. Für die Betreuung der Versuchstiere war ein approbierter Tierarzt kontinuierlich anwesend. Zunächst wurde eine *Localizer*-Sequenz akquiriert, um die eigentlichen Untersuchungssequenzen zu planen.

Folgende Sequenzen wurden generiert, eine vergleichende Übersicht zeigt Tabelle 2:

1. Protonendichte gewichtete SPIR (*Spectral Presaturation with Inversion Recovery*)  
 Aufnahme (PD SPIR) in sagittaler Ebene.  
 Voxel Größe 0,3 mm x 0,3 mm x 1 mm, Schichtdicke 1 mm, TE 40 ms, TR 2071 ms,  
*Flip Angle* 90°, FOV 60x70x15 mm, Echos 1, Aufnahmezeit 7 min 14 s.
2. T1-gewichtete TSE Aufnahme in sagittaler Ebene.  
 Voxel Größe 0,3 mm x 0,3 mm x 1 mm, Schichtdicke 1 mm, TE 20 ms, TR 500-800ms,  
*Flip Angle* 90°, FOV 60x70x15mm, Echos 1, Aufnahmezeit 7 min 18 s
3. Protonendichte gewichtete SPIR Aufnahme in transversaler Ebene  
 Voxel Größe 0,3 mm x 0,3 mm x 1 mm, Schichtdicke 1 mm, TE 40 ms, TR 2588 ms,  
*Flip Angle* 90°, FOV 60x60x19mm, Echos 1, Aufnahmezeit 7min45s
4. T2-gewichtete TSE Aufnahme in sagittaler Ebene  
 Voxel Größe 0,3 mm x 0,4 mm x 1 mm, Schichtdicke 1 mm, TE 17, TR 2013 ms,  
*Flip Angle* 90°, Echos 5 (17-119 ms), Aufnahmezeit 8 min 59 s
5. T2\*-gewichtete GRE Aufnahme in sagittaler Ebene  
 Voxel Größe 0,34 mm x 0,45 mm x 1 mm, Schichtdicke 1 mm, TE inphase 4,6 ms, TR  
 46 ms, *Flip Angle* 15°, Echos 3, Aufnahmezeit 7min33s

	<b>Ebene</b>	<b>FOV (mm)</b>	<b>TE (ms)</b>	<b>TR (ms)</b>	<b>Flip Angle</b>	<b>Echos</b>	<b>Aufnahme- zeit</b>
<b>PD SPIR</b>	sagittal	60x70x15	40	2071	90°	1	7min 14s
<b>T1</b>	sagittal	60x70x15	20	500-800	90°	1	7min 18s
<b>PD SPIR</b>	transversal	60x60x19	40	2588	90°	1	7 min 45s
<b>T2</b>	sagittal	60x70x15	17	2013	90°	5; 12+n*26ms	8min 59s
<b>T2*</b>	sagittal	60x70x15	4,6	46	15°	3; 4,6+n*6,9ms	7min 33s

**Tabelle 1: Übersicht MRT Sequenzen**

### 2.2.4.3. Auswertung der MRT-Datensätze

Die Auswertung der MRT Daten erfolgte mit dem Programm Impax® EE von Agfa HealthCare, Morselt Belgien, die Flächenberechnung zur Bestimmung des Ergusses wurde mit OsiriX, Pixmeo Sàrl, durchgeführt.

### 2.2.4.3.1. Signal-to-Noise Ratio

Es wurden für den Verlauf der Signalintensität der implantierten Stammzellen manuell *Regions of interest* (ROI) in jeder der zwei Defektstellen einzeln definiert. Der Mittelwert der beiden Messungen wurde als Signalintensität des Defekts (SI Defekt) interpretiert und mit der Standardabweichung der Signalintensität der Umgebung (SD Noise) verglichen. Daraus resultiert das Signal-zu-Rausch Verhältnis (*Signal-to-Noise Ratio* (SNR)) (Firbank et al., 1999, S. N263-4; Henkelman, 1985, S. 233).

$$SNR = \frac{SI_{Defekt}}{SD_{Noise}}$$

Dementsprechend steht eine hohe SNR für eine höhere Signalintensität des untersuchten Gewebes. Resovist® hat einen negativen Effekt auf die Signalintensität, vor allem in T2/T2\*-gewichteten Sequenzen und führt somit zu niedrigeren SNR.

Die Messung der SNR wurde in allen sagittalen Sequenzen durchgeführt.



**Abbildung 7: Beispiel der SNR Messung**

Die mittlere Signalintensität innerhalb der Implantate wurde durch die Standardabweichung der ROI in der Luft geteilt.

Im Rahmen der Datenakquisition wurde aus den T2- und T2\*-Sequenzen automatisch Karten (*maps*) generiert, in denen pixelbasiert die T2 und T2\* Zeiten in Millisekunden als Grauwert-Bild ausgegeben wurden. Für Pixel, in denen die Berechnung nicht

durchgeführt werden konnte, wurde der Fehlwert „-2“ angegeben und bei späteren Berechnungen nicht berücksichtigt. Die Messung der durchschnittlichen T2- und T2\*-Zeit wurde analog zur Messung der Signalintensität der Defekte gemessen.

### 2.2.4.3.2. Synovialmembran

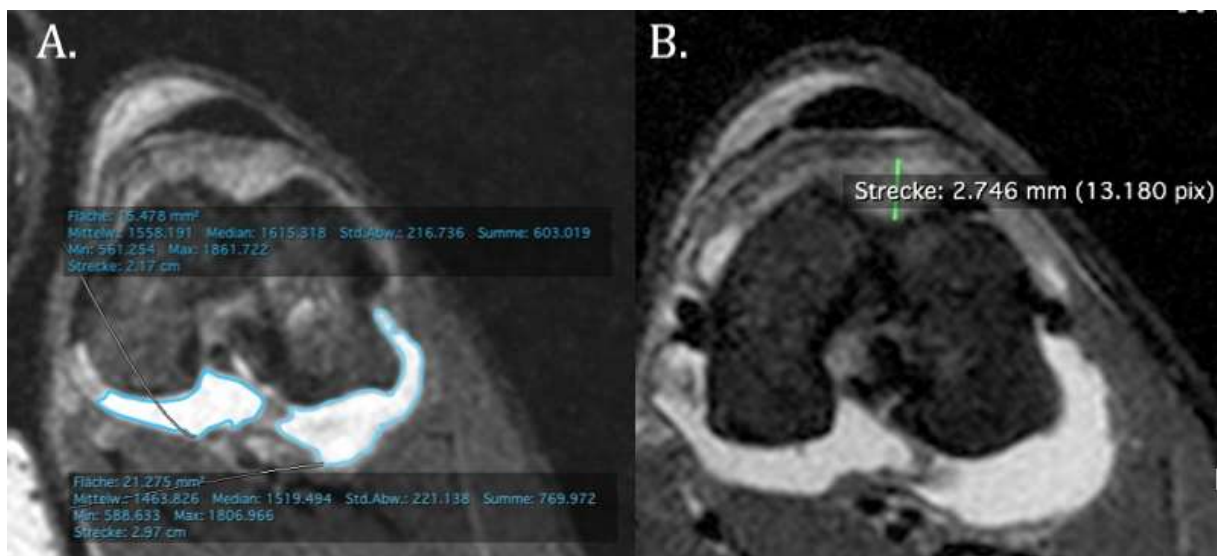
Für die (Verlaufs-)Beurteilung der Synovialis wurde in den transversalen Protonendichte gewichteten Sequenzen (PD-SPIR) die maximale Dicke der Synovialis auf Höhe der Trochlea femoris gemessen und die Mittelwerte mit Standardabweichung zu jedem Messezeitpunkt berechnet (s. Abb. 8B).

### 2.2.4.3.3. Kniegelenkserguss

Der Gelenkerguss nach Implantation wurde ebenfalls in der transversalen PD SPIR Sequenz bestimmt. Hierzu wurde in jeder Schicht die Ergussfläche  $A_{Erguss}$  gemessen und mit der Schichtdicke  $d$  (1 mm) multipliziert (S. Abb. 8A). Diese Volumina wurden dann aufsummiert:

$$Vol_{Erguss} = \sum (A_{Erguss,i} \times d)$$

$A_{Erguss,i}$  beschreibt die gemessene Fläche der Schicht  $i$  und  $d$  die Schichtdicke (Østergaard et al., 1999, S. 921). Zur besseren Anschaulichkeit wurde das Volumen von  $mm^3$  in  $\mu l$  umgerechnet.



**Abbildung 8: Messungen in der transversalen PD SPIR Sequenz**

A) Beispiel der Flächenbestimmung  $A_{Erguss}$  einer Schicht  $i$ .

B) Beispiel der Bestimmung der Dicke der Synovialmembran in der transversalen PD-gewichteten Schicht



#### 2.2.4.3.4. Knochenödem

Um den Verlauf des Knochenödems im Femur der Versuchstiere zu vergleichen, wurde jeweils die Signalintensität von einer ROI knapp proximal der osteochondralen Defekte ( $SI_{\text{ödem}}$ ) und die Signalintensität im mittleren Femuranteil ( $SI_{\text{Knochen}}$ ) in der PD SPIR Sequenz gemessen. Hieraus wurde der Quotient berechnet:

$$Q_{\text{ödem}} = \frac{SI_{\text{ödem}}}{SI_{\text{Knochen}}}$$

Durch die Unterdrückung von Signalen aus dem Fettgewebe eignet sich diese Sequenz, um frühzeitig Knochenödeme zu diagnostizieren (Sadineni et al., 2015, S. 11; Zee et al., 1992, S. 356).



**Abbildung 9: Messmethode des Knochenödems in der PD SPIR Sequenz**

Die Signalintensität des Knochens knapp hinter der Defektzone wird mit der Signalintensität der Femurdiaphyse verglichen.

### 2.2.4.3.5. Morphologische Beurteilung

Um das gebildete Regeneratgewebe zu beurteilen wurden die MRT-Bilder gemäß einer modifizierten *2D-magnetic resonance observation of cartilage repair tissue* (MOCART) Skala (s. Tabelle 3) bewertet (Schreiner et al., 2019, S. 12). Die Verwendung modifizierter MOCART Skalen im Kaninchenmodell wurde bereits in anderen Studien verwendet (Murata et al., 2020, S. 83). Hierzu wurden die MRT-Bilder der Protonendichte gewichteten Sequenzen anhand von 7 Unterpunkten bewertet. Die maximal erreichbare Punktzahl war 80. Die Beurteilung wurde nur für die 24W Gruppe für U3 und U4 durchgeführt, da bei U1 und U2 aufgrund der kurzen *in vivo* Zeit der Implantate keine validen Ergebnisse zu erwarten waren.

Modifizierte 2D- MOCART 2.0 Skala

Kategorie / Unterpunkte	Punkte
<b>Grad der Defektfüllung</b>	
Komplett	20
Hypertrophie	15
Inkomplett > 50%	10
Inkomplett < 50%	5
Subchondraler Knochen freiliegend	0
<b>Integration des Ersatzgewebes</b>	
Komplett	15
Grenze sichtbar	10
Defekt sichtbar < 50%	5
Defekt sichtbar > 50%	0
<b>Oberfläche</b>	
Oberfläche intakt	10
Oberfläche defekt < 50%	5
Oberfläche defekt > 50% der Tiefe	0
<b>Erguss</b>	
<60µl	15
60µl - 90µl	10
90µl - 120µl	5
>120µl	0
<b>Struktur</b>	
Homogen	5
Inhomogen	0
<b>Signalintensität</b>	
Normal	10
Fast normal	5
Unnormal	0
<b>Subchondraler Knochen</b>	
Intakt	5
Granulationsgewebe/Zysten/Sklerose	0
<b>Ergebnis</b>	<b>(0-80)</b>

**Tabelle 2: Skala angelehnt an den MOCART 2.0 Knee-Score (Schreiner, 2019, S.12)**

### 2.2.5. Statistische Auswertung

Die Datenerfassung und visuelle Aufarbeitung erfolgte mit Excel® (Microsoft, Redmond, USA), die statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse mittels SPSS® (Version 27, IBM, Armonk, USA). Alle Messungen wurden zunächst auf Normalverteilung geprüft. Hierzu erfolgten die grafische Darstellung mittels eines Histogramms und Q-/Q-Diagramm sowie die Prüfung durch den Kolmogorov-Smirnov-Test und den Shapiro-Wilk-Test. Für normalverteilte Daten wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Nicht normalverteilte Daten wurden mittels Boxplots mit Median, Minimum- und Maximum-Wert sowie unterem und oberem Quartil visualisiert. Sollten sie mit einer Gruppe verglichen werden, bei der normalverteilte Daten vorlagen, wurden zur besseren Vergleichbarkeit auch diese Daten als Boxplot ausgegeben. Vergleiche der Signal-zu-Rausch-Verhältnisse sowie der Beurteilung von Gelenkerguss und Knochenödem zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (R+ und R-) wurden bei normalverteilten Daten mit dem Student t-Test für unabhängige Variablen auf Signifikanz überprüft. Waren die Daten nicht normalverteilt, wurde die zentrale Tendenz mit dem Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben ermittelt. Anhand einer ANOVA (Modell mit Berücksichtigung von Messwiederholungen) oder, bei nicht normalverteilten Daten mittels des Wilcoxon-Tests bzw. bei mehrfacher Messwiederholung mittels Friedman-Test, wurde der zeitliche Verlauf des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen untersucht und eine *post-hoc*  $\alpha$ -Fehler-Korrektur nach Bonferroni durchgeführt. Auf diese Fehlerkorrektur wurde bei Untergruppentests mit geringer Stichprobengröße gemäß dem wissenschaftlichen Konsens für explorative Studien verzichtet (Bender et al., 2007, S. 28). Bei signifikanten Ergebnissen wird eine Kontrolle der Hypothesen mittels paarweisen Vergleiches in einer neuen Studie mit vorgeplanter *power* empfohlen (Saville, 2015, S. 734). Die nicht korrigierten *p*-Werte werden als  $p_x$  angegeben. Als Signifikanzniveau wurde für alle Tests  $\alpha \leq 0,05$  verwendet.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Allgemeine Ergebnisse

Es konnten von allen 36 NZW Kaninchen komplette MRT-Datensätze zu jedem Messzeitpunkt gewonnen werden. Damit stehen für diese Arbeit 108 (1W R+ n=18 und R- n=18; 4W R+ n=18 und R- n=18; 12 W R+ n=12 und R- n=12; 24W R+ n=6 und R- n=6) Datensätze zur Verfügung. Für die Untersuchung des Knochenödems, der Synovialis und der Ergussvolumina konnten alle Tiere berücksichtigt werden. Bei einigen wenigen Tieren zeigten sich ab der Untersuchung U2 in der 4. Woche *post implantationem* jedoch die Defektstellen mit Flüssigkeit gefüllt. Diese Untersuchungsergebnisse wurden bei der statistischen Auswertung der Implantate nicht mit eingeschlossen. Die Anzahl reduziert sich dementsprechend. Es handelt sich um 1 Tier bei der Untersuchung nach 4 Wochen (U2) (Tiernummer 143, R+), sowie 3 Tiere der U3 (Tiernummer 133, R+; Tiernummer 136, R+; Tiernummer 140, R-). Der Defekt, der in einem Tier bei der U2 noch mit Flüssigkeit gefüllt war, unterschied sich bei der Untersuchung in Woche 12 bildmorphologisch nicht mehr von den Vergleichsdefekten.

Hieraus ergab sich für die Untersuchung des SNR im Vergleich zwischen R+ und R- in den sagittalen Schichten für alle folgenden Unterpunkte eine Anzahl der verwendeten Datensätze von n=18 für R+ und R- bei U1, bei U2 n=17 für R+ und n=18 für R-, bei U3 n=10 für R+ und n=11 für R- und für U4 n=6 sowohl für R+ als auch R-.

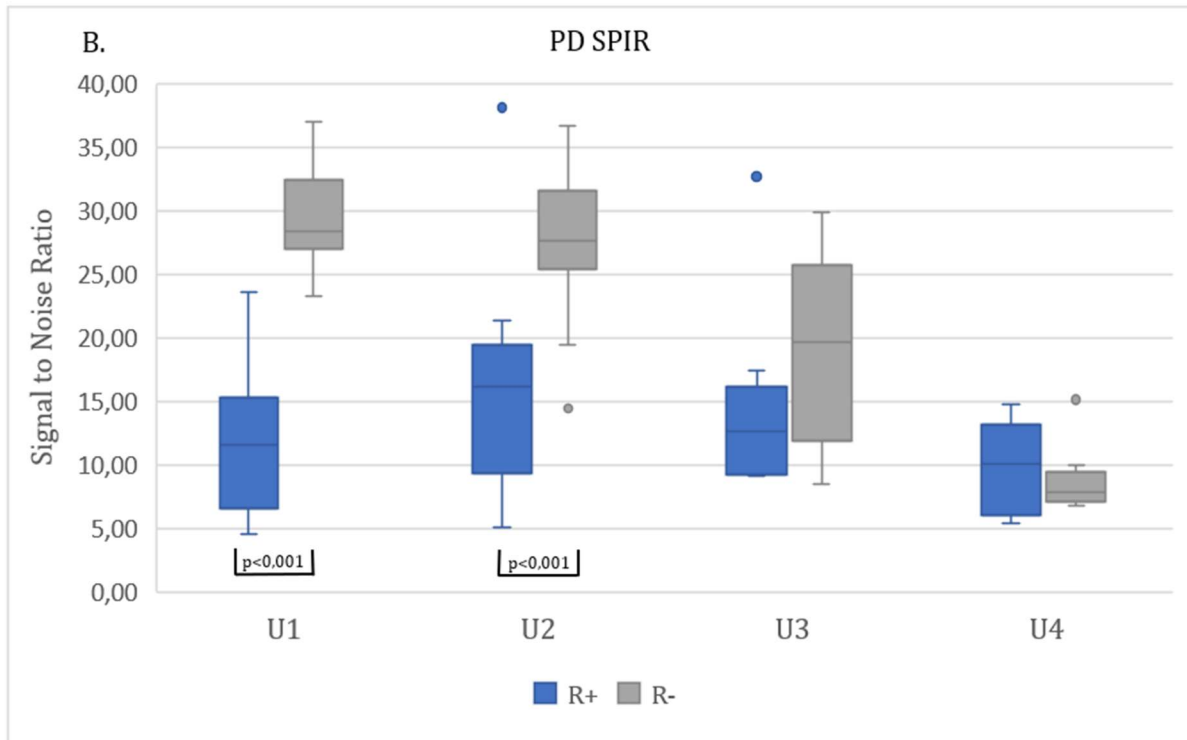
### 3.2. PD STIR Sequenz in sagittaler Ebene

#### 3.2.1. Signal zu Rausch Verhältnis

Nur in der 1. Woche bestand eine Normalverteilung für die Messwerte. Hier unterschieden sich die Resovist®-markierten Implantate R+ durch eine niedrigere SNR signifikant von der Kontrolle R- ( $p_{1W} < 0,001$ ). Auch bei der 2. Untersuchung (U2) konnte noch eine signifikant niedrigere SNR für die Resovist®-markierten Implantate dargestellt werden ( $p_{U2} < 0,001$ ). Für die U3 nach 12 Wochen und die U4 nach 24 Wochen konnte kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den R+ und R-Implantaten festgestellt werden ( $p_{12W} = 0,139$ ;  $p_{24W} = 0,873$ ) (siehe Abb. 10).

### A. Mittelwerte und Mediane PD SPIR

	MW ± SD			Median u. IQR	
R+U1	11,90	±	5,64	11,53	8,73
R- U1	29,42	±	4,08	28,36	5,78
R+U2	16,25	±	7,65	16,14	11,03
R- U2	27,78	±	5,58	27,59	7,41
R+U3	19,21	±	13,86	14,23	19,31
R- U3	20,32	±	8,42	20,57	15,16
R+U4	9,84	±	3,62	10,06	7,09
R- U4	9,06	±	3,19	7,79	4,43



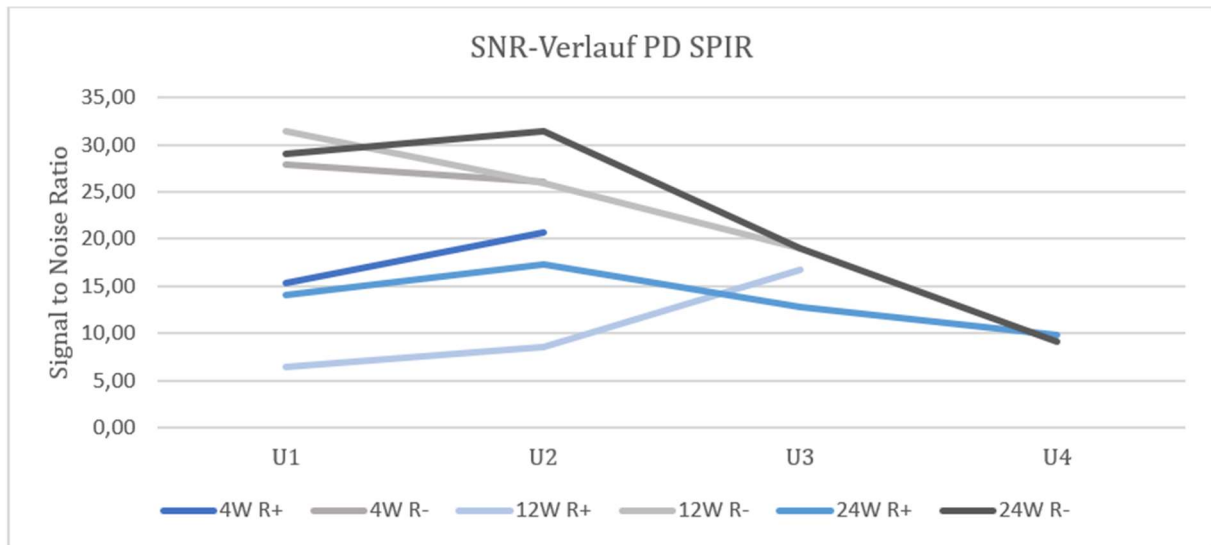
**Abbildung 10: Deskriptive Statistik und Boxplot in der PD SPIR Sequenz**

Vergleiche der R+ und R- Gruppen untereinander. Signifikante Unterschiede konnten in den Untersuchungen nach 1 und nach 4 Wochen nachgewiesen werden (U1 und U2). Mit zunehmender *in vivo* Zeit nahm die SNR ab.

Beim Vergleich der Messwerte im zeitlichen Verlauf ergab sich für die Gruppe 4W keine signifikante Änderung ( $p_{1U-2U}=0,239$ ). Dies bestätigte sich, auch bei getrennter Analyse der R+ und R- Gruppen. In der Gruppe 12W konnten ebenso keine signifikanten Unterschiede für einen Abfall des SNR im zeitlichen Verlauf gefunden werden ( $p_{xU1-U2}$  und  $p_{xU1-U3} \gg 0,05$ ). Beim Subgruppenvergleich R+ und R- innerhalb der 12W Gruppe zeigte sich zwar für R- eine signifikante Verminderung des SNR zwischen U1 und U3 ( $p_{xU1-U3}=0,048$ ), aufgrund der ausgeschlossenen Messungen in dieser Gruppe war die Stichprobe aber sehr klein. Für die 24W Gruppe ließ sich ein signifikanter Abfall der SNR zwischen den einzelnen Untersuchungen von U1 bis U4 nachweisen. In der

Subgruppenanalyse bestätigte sich dies nur für die R- Gruppe ( $p_{U1-U2;R-}=0,046$ ;  $p_{U1-U3;R-}=0,046$ ;  $p_{U1-U4;R-}=0,028$ ). In der R+ Gruppe waren nur der Abfall der SNR von U1 bis zu U4 signifikant ( $p_{U1-U4;R+}=0,028$ ).

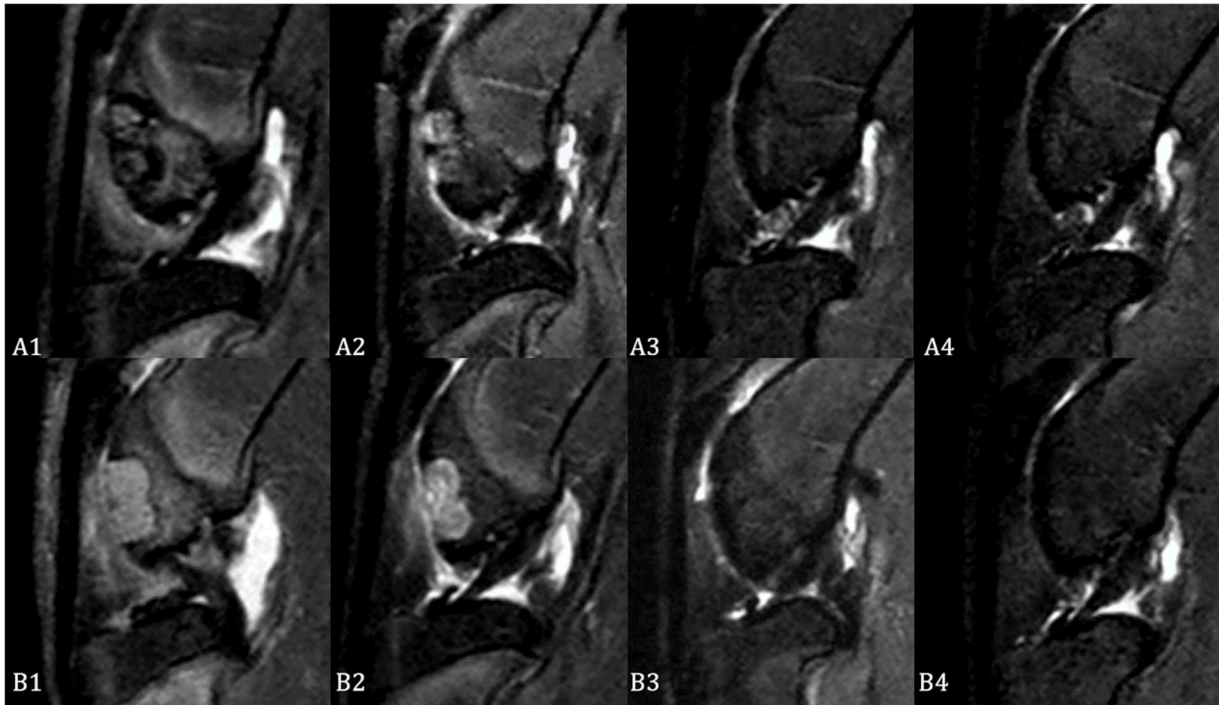
Insgesamt zeigte sich, dass sich die Messwerte der unmarkierten Implantate, die initial mit einer höheren SNR starteten, sich im zeitlichen Verlauf den SNR-Werten der Resovist®-markierten Implantate angleichen (Siehe Abb. 11).



**Abbildung 11: Verlauf des SNR der Subgruppen in der PD SPIR Sequenz**

Das Signal-zu-Rausch Verhältnis der Resovist®-markierten Implantate lag für alle Untergruppen bei U1 und U2 noch signifikant höher als die der Kontrollimplantate, ab U3 näherten sich die Gruppen an.

Bildmorphologisch stellten sich die Resovist®-markierten Implantate bei der U1 in Bezug auf den umgebenden Knochen deutlich hypointens, die der unmarkierten Kontrollen hyperintens dar (Abbildung 12 A1 und B1). Im zeitlichen Verlauf glichen sich die Implantate mit zunehmender *in vivo* Zeit dem umgebenden Knochensignal an. Nach 24 Wochen waren die Implantate kaum noch abgrenzbar (Abbildung 12 A4 und B4).



**Abbildung 12: PD SPIR: Repräsentative Abbildungen von R+ und R- Implantaten im Verlauf**

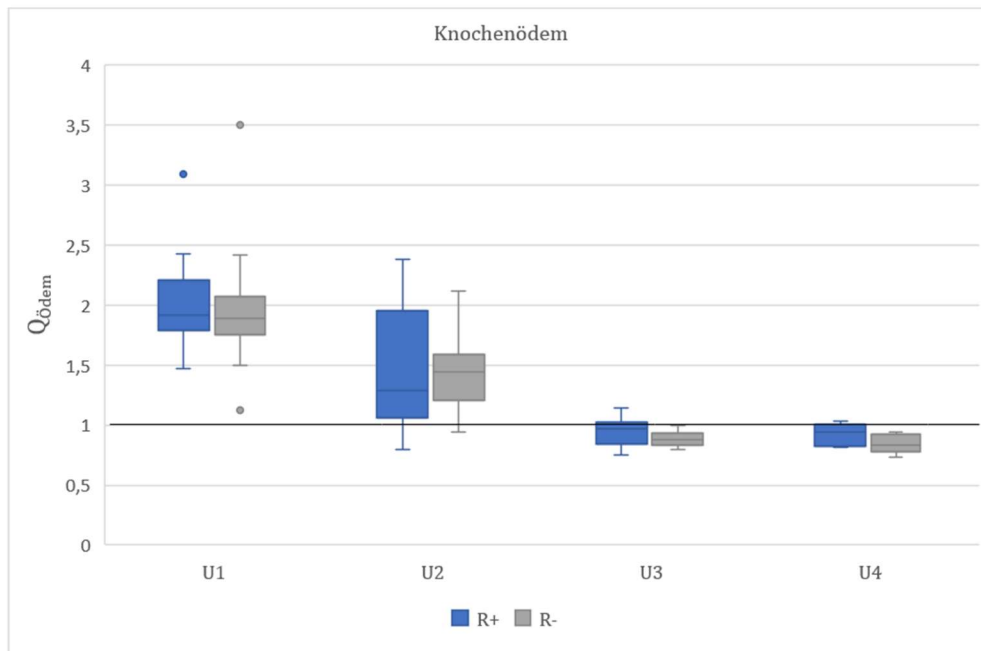
A1-4: Tier 7, R+, U1-U4; B1-4: Tier 11, R-, U1-U4

In den Implantaten stieg die Signalintensität in beiden Gruppen (R+ und R-) zunächst an (A2, B2). Im Laufe der weiteren Integration der Implantate nahm die Signalintensität wieder ab und die Implantate waren kaum mehr abgrenzbar (A3 u. A4, B3 u. B4). Zudem war bei zunehmender *in vivo* Zeit eine deutliche Reduktion der Ergussbildung und des Knochenödems zu erkennen.

### 3.2.2. Messung des Knochenödems

Der Verlauf des Knochenödems zeigte zwischen den Gruppen mit Resovist®-markierten und unmarkierten Implantaten zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede ( $p_{U1}=0,742$ ;  $p_{U2}=0,83$ ;  $p_{U3}=0,165$ ;  $p_{U4}=0,134$ ). Im zeitlichen Verlauf näherten sich die Werte von  $Q_{\text{ödem}}$  dem Wert 1 (Signalintensität zwischen der Femurdiaphyse und der Epiphyse knapp proximal der Defektzone gleich) (Abbildung 12). Bei U2, nach 4 Wochen bestand gerade innerhalb der Gruppe mit Resovist®-markierten Implantaten eine hohe Streuung der Werte, wohingegen bei U3 und U4 eine enge Verteilung um den Median dargestellt wurde. Testet man den zeitlichen Verlauf von  $Q_{\text{ödem}}$  für die einzelnen Gruppen 4W, 12W und 24W getrennt nach R+ und R-, bestätigte sich der schon im Diagramm (s. Abb. 13) gewonnene Eindruck einer signifikanten Änderung zwischen den Untersuchungen U1, U2 und U3. Die einzige Ausnahme bildete die Subgruppe 12W R+ bei U1 zu U2 ( $p_{xU1-U2}=0,12$ ) und bei U2 zu U3 ( $p_{xU2-U3}=0,11$ ). Diese schien für die breite Streuung der summierten Werte in Abb. 13 Boxplot U2 R+ verantwortlich zu sein.

Zwischen der 12. Woche und der 24. Woche gab es für alle Gruppen keine signifikanten Unterschiede mehr.



**Abbildung 13: Q<sub>ödem</sub> zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten**

Die Boxplots stellen die Messwerte der Gruppen zusammen dar. Aufgeteilt in R+ und R- zu den Untersuchungszeitpunkten. Daher ist n=18 je Gruppe bei U1, n=18 bei U2, n=12 bei U3 und n=6 bei U4. Die schwarze horizontale Linie repräsentiert den Quotienten von 1, entsprechen einer Isointensität der zwei Messpunkte.

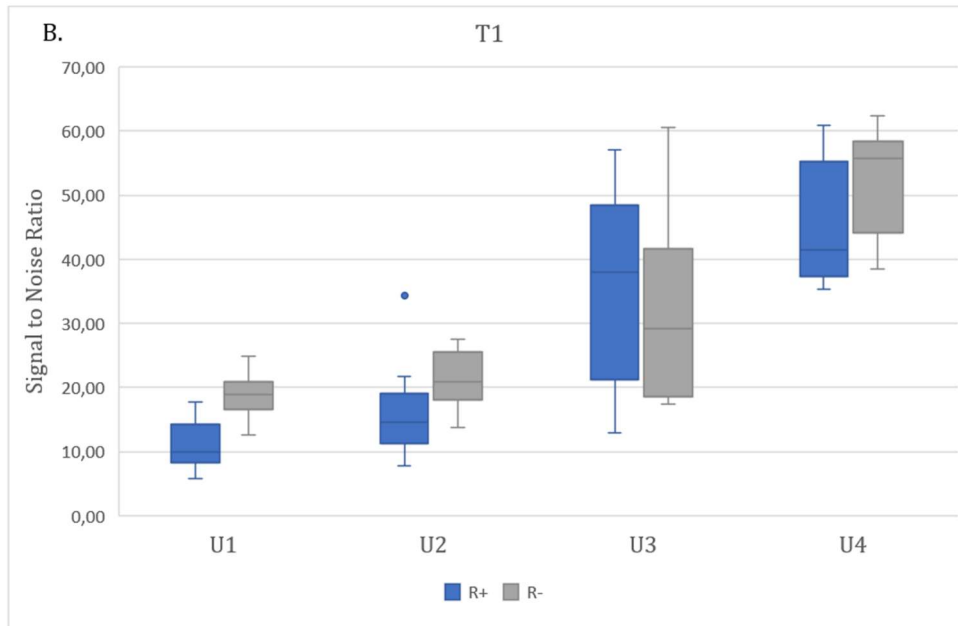
### 3.3. T1 TSE Sequenz in sagittaler Ebene

In der T1-gewichteten Untersuchung bestand bei der Untersuchung nach 1 Woche (U1) zwischen den Resovist<sup>®</sup>-markierten und den unmarkierten Implantaten kein signifikanter Unterschied ( $p_{U1}=0,704$ ). Dies bestätigte sich auch in den folgenden Untersuchungen ( $p_{U2}=0,264$ ,  $p_{U3}=0,958$ ,  $p_{U4}=0,672$ ). Gerade bei den späteren Untersuchungen nahm die Streuung der Werte zu ( $IQR_{R+U3}=27,15$ ,  $IQR_{R-U3}=23,04$ ) (s. Abbildung 14 B). Zu beachten ist jedoch die sinkende Zahl der eingeschlossenen Tiere.



### A. Mittelwerte und Mediane T1

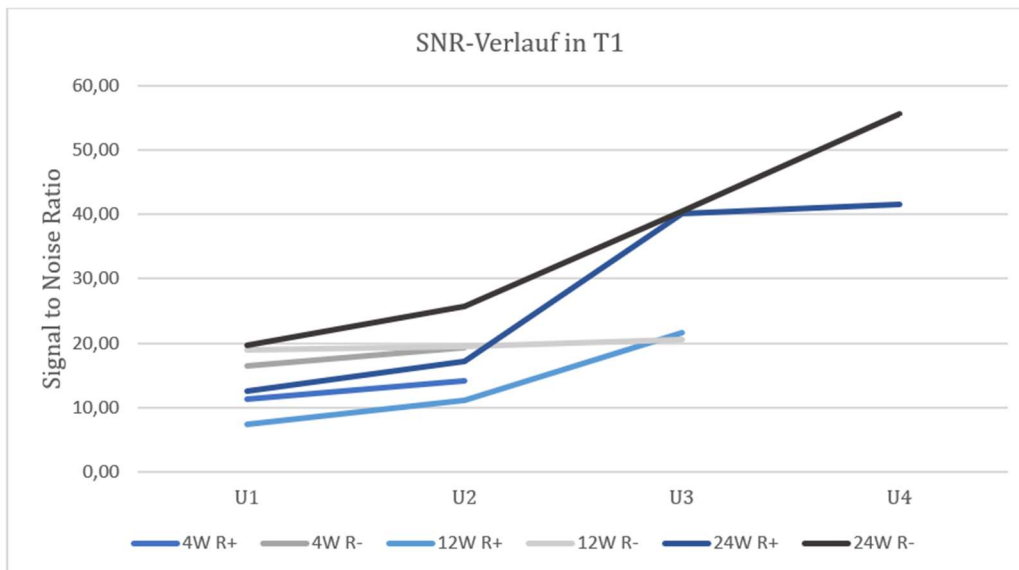
	MW ± SD			Median u. IQR	
R+U1	10,82	±	3,38	9,98	5,82
R- U1	18,74	±	3,34	18,84	4,21
R+U2	15,72	±	6,33	14,58	7,70
R- U2	21,18	±	4,14	20,94	7,48
R+U3	36,05	±	14,60	37,89	27,15
R- U3	31,77	±	14,83	29,13	23,04
R+U4	45,10	±	9,90	41,50	17,96
R- U4	52,54	±	8,71	55,68	14,36



**Abbildung 14: Deskriptive Statistik und Boxplot in der T1 TSE Sequenz**

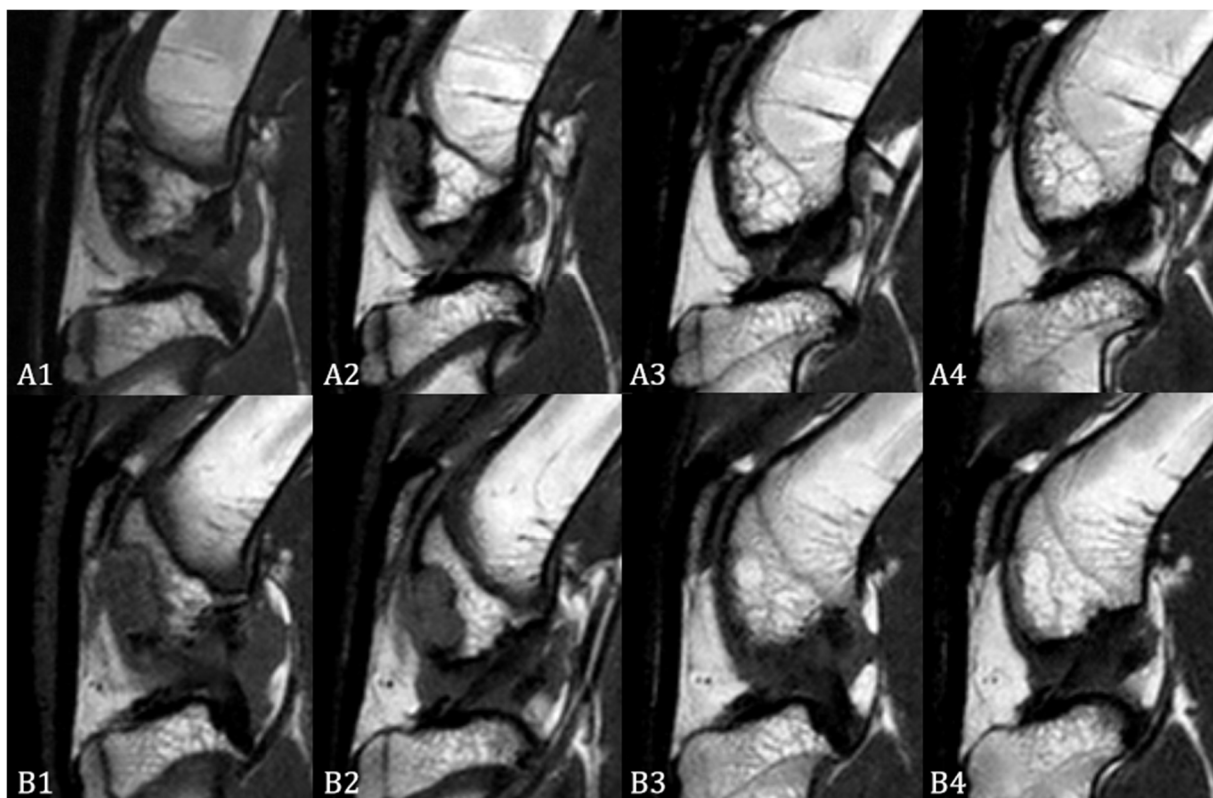
Vergleiche der Resovist®-markierten und Resovist®-unmarkierten Gruppen untereinander. Signifikante Unterschiede konnten nicht nachgewiesen werden. Mit zunehmender *in vivo* Zeit nahm die SNR zu.

Betrachtet man den Verlauf des SNR mit längerer *in vivo* Zeit, so war dieses von der Tendenz her steigend. Dies bestätigte sich auch für alle Untergruppen (s. Abbildung 15). Eine Signifikanz war bei dem Vergleich von U1 zu U3 für die 12W R+ und die 24W R+ und R- sowie bei U1 zu U4 für R+ und R- der 24W Gruppe zu sehen (12WR+:  $p_{xU1-U3}=0,025$ , 24WR+:  $p_{xU1-U3}<0,001$ ,  $p_{xU1-U4}<0,001$ , 24WR-:  $p_{xU1-U3}=0,027$ ,  $p_{xU1-U4}<0,001$ ).



**Abbildung 15: Verlauf der SNR der Subgruppen in der T1 Sequenz**

Für alle Gruppen zeigte sich ein Trend für eine steigende SNR mit längerer *in vivo* Zeit. Trotz fehlender Signifikanz starteten alle Subgruppen mit unmarkierten Implantaten mit einer höheren SNR bei U1. Bildmorphologisch waren die R+ und die R- Implantate im Vergleich zum umgebenden Knochen hypointens bei der U1 und glichen sich bis zur U4 vollständig dem Umgebungssignal an (s. Abbildung 16). Eine Unterscheidung zwischen den Resovist®-markierten und unmarkierten Implantaten war bei U4 nicht mehr möglich.



**Abbildung 16: T1-Wichtung: Repräsentative Abbildungen von R+ und R- Implantaten im Verlauf**

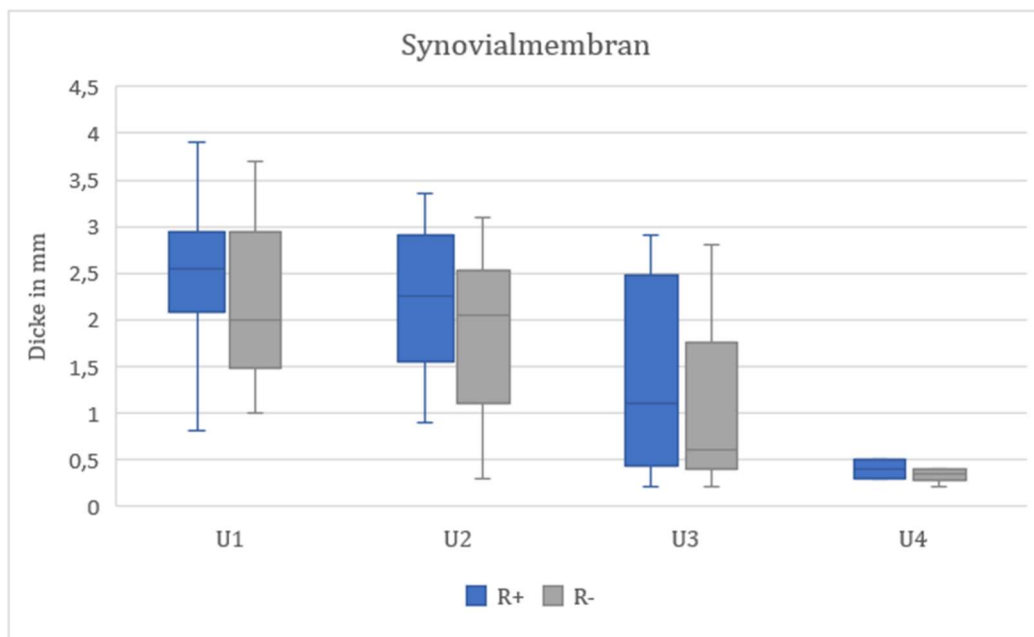
Die Resovist®-markierten Implantate (A) zeigten eine randständige Hypointensität(A1-A2) anschließend wirkte das gebildete Regeneratgewebe isointens zum Knochen. Der Hoffa-Fettkörper wirkte bei U1 (A1+B1) aufgrund eines Ödem hypointens zu späteren Untersuchungen. Ab 12 Wochen konnten die Resovist®-markierten Implantate (A3+A4) nicht mehr von den unmarkierten Implantaten (B3+B4) unterschieden werden.

### **3.4. PD SPIR Sequenz in transversaler Ebene**

#### **3.4.1. Synovialmembran**

Die Dicke der Synovialmembran in der transversalen Ebene war in der Gruppe mit Resovist®-markierten Implantaten bei U1 im Mittelwert  $2,5 \pm 0,7$  mm und bei der unmarkierten Kontrollgruppe  $2,2 \pm 0,83$  mm. Waren die Mittelwerte bei U2 4 Wochen nach der Operation mit  $2,1 \pm 0,7$  mm für die Resovist®-markierten Implantate und  $1,8 \pm 0,9$  mm noch ähnlich zu U1 nach 1 Woche, sanken sie bis zur Untersuchung in der 12. Woche deutlich ( $MW_{U3R+} = 1,3 \pm 1,0$  mm und  $MW_{U3R-} = 0,9 \pm 0,8$  mm). Dieser Trend setzte sich mit zunehmender *in vivo* Zeit fort. Nach 24 Wochen (U4) zeigt die Synovialmembran der Knie die Resovist®-markierte Implantate enthielten, im Median eine Dicke von 0,4 mm und IQR 0,2 mm und die der Kontrollgruppe einen Median 0,35 mm und IQR 0,13 mm. Insbesondere die IQR zeigt sich bei U4 im Vergleich zu den vorherigen Untersuchungen deutlich verringert (s. Abbildung 17).

Signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe mit Resovist®-markierten Implantaten und unmarkierten Implantaten bestanden jedoch zu keinem Zeitpunkt ( $p_{U1} = 0,217$ ;  $p_{U2} = 0,247$ ;  $p_{U3} = 0,375$ ;  $p_{XU4} = 0,375$ ).



**Abbildung 17: Vergleich der Synovialmembran-Dicke zu den Untersuchungszeitpunkten U1-U4**

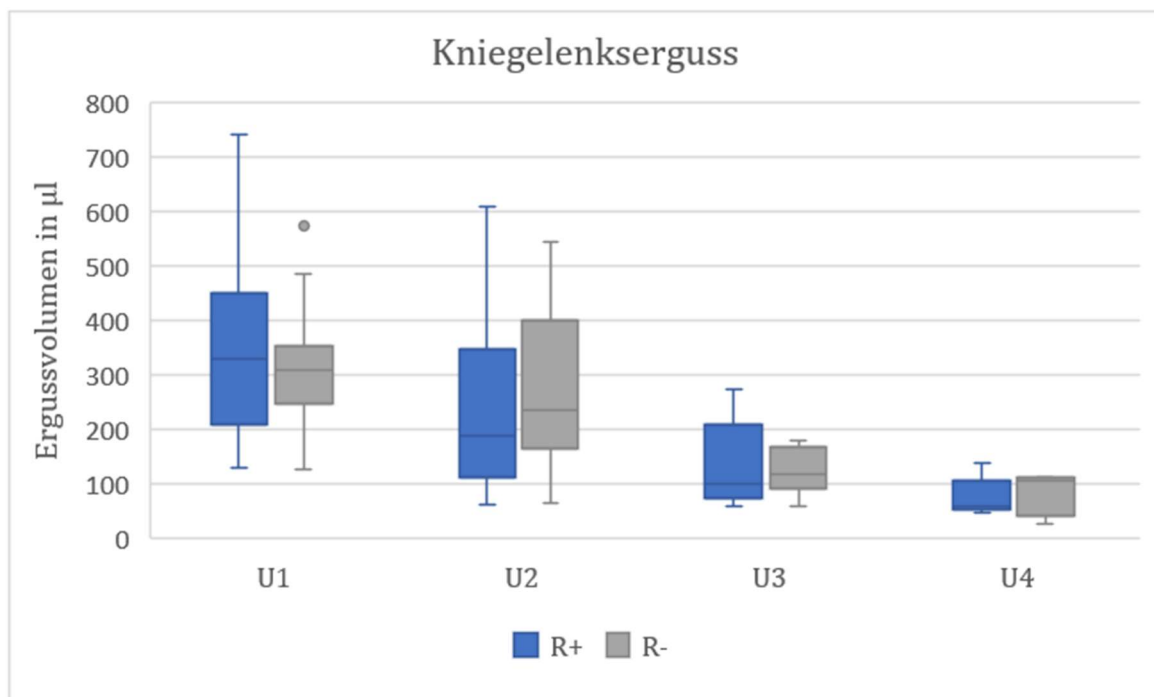
Sowohl für die Knie mit Resovist®-markierten Implantaten als auch den unmarkierten Implantaten nahm die Dicke der Synovialmembran mit zunehmender *in vivo* Zeit ab. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bestand nicht.

### 3.4.2. Kniegelenkserguss

Postoperativ bestand bei allen Versuchstieren ein nicht unwesentlicher Kniegelenkserguss. Dieser war bei den Tieren mit Resovist®-markierten Implantaten 1 Woche *post implantationem* im Mittel  $353 \pm 161 \mu\text{l}$  und bei den Tieren der Kontrollgruppe  $308 \pm 109 \mu\text{l}$ . Im Mittel sank das Volumen des Ergusses bei den Tieren mit Resovist®-markierten Implantaten auf  $237 \pm 158 \mu\text{l}$  4 Wochen nach der Operation (U2),  $133 \pm 79 \mu\text{l}$  nach 12 Wochen (U3) und  $75 \pm 35 \mu\text{l}$  nach 24 Wochen (U4). Für die Vergleichsgruppe mit unmarkierten Implantaten waren die entsprechenden Volumina  $271 \pm 144 \mu\text{l}$  bei U2,  $124 \pm 41 \mu\text{l}$  bei U3 und  $84 \pm 37 \mu\text{l}$  bei U4. Betrachtet man jedoch die Volumenveränderung für jedes Tier einzeln, gab es zwischen den Messzeitpunkten auch eine Volumenzunahme. So stieg bei je 6 Tieren der Resovist®-markierten und unmarkierten Gruppe das Volumen zwischen U1 und U2. Zwischen U2 und U3 traf dies auf ein Tier mit Resovist®-markierten Implantaten und zwei Tiere der unmarkierten Gruppe zu. Ein gleiches Verhältnis zeigte sich zwischen den letzten beiden Untersuchungen nach 12 und nach 24 Wochen. Eine gehäufte Verteilung auf eine der drei Untergruppen (4W, 12W und 24W) lag nicht vor. Wie auch bei der Untersuchung der Synovialdicke waren die gemessenen Volumina zwischen den Kniegelenken mit Resovist®-markierten Implantaten und denen, die unmarkierte

Kontrollimplantate enthielten, nie signifikant verschieden ( $p_{U1}=0,334$ ;  $p_{U2}=0,502$ ;  $p_{U3}=0,726$  und  $p_{xU4}=0,818$ ).

Um die Ergebnisse einschätzen zu können, wurden die Gelenkflüssigkeitsvolumina von 8 kontralateralen Knien gemessen. Diese hatten im Mittel ein Volumen von  $25 \pm 5 \mu\text{l}$ . Damit lagen sie im Vergleich zu jedem Untersuchungszeitpunkt unterhalb der gemessenen Mittelwerte der operierten Kniegelenke. Insgesamt konnte nur ein Erguss bei der Untersuchung nach 24 Wochen ein Volumen innerhalb der Standardabweichung der nicht operierten Knie erreichen.



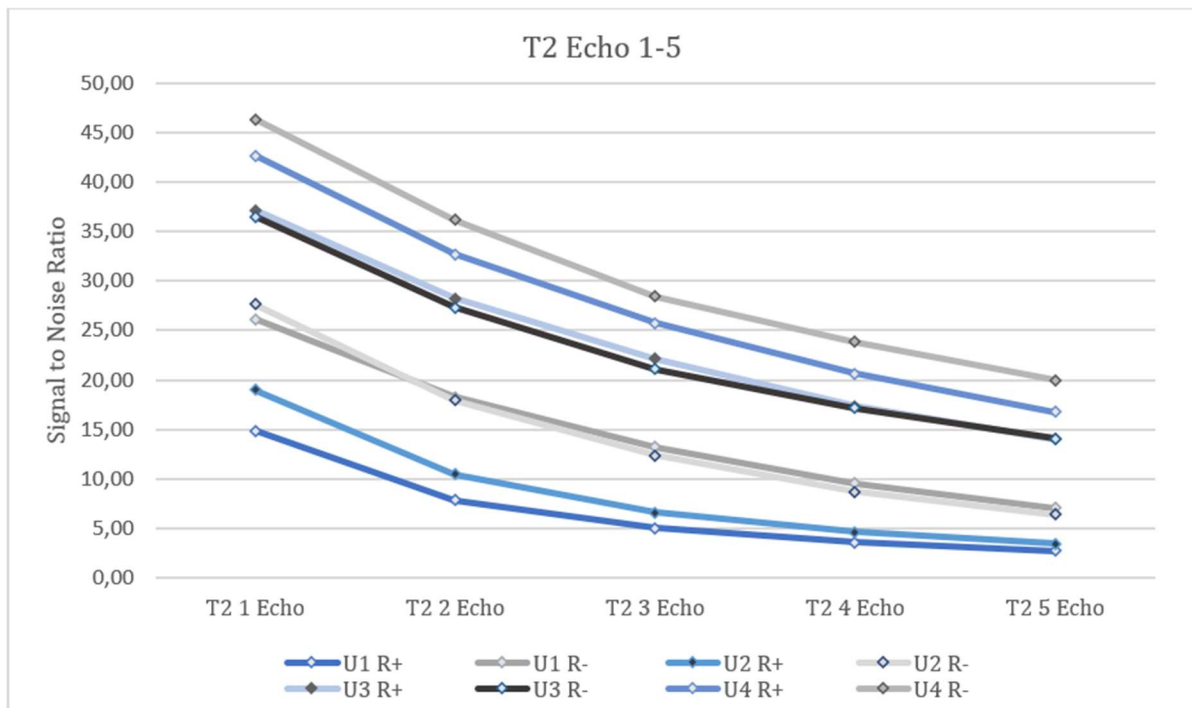
**Abbildung 18: Untersuchung des Kniegelenksergusses**

Das Ergussvolumen nahm im Verlauf im Mittel ab, insbesondere der IQR verkleinerte sich zunehmend. Ein extremer Wert zeigte sich bei U1 in der Gruppe die Resovist®-markierte Implantate enthielt. Dabei handelt es sich um Tier 133, bei dem bei U3 die Defektstellen gänzlich mit Flüssigkeit ausgefüllt waren.

### 3.5. T2-gewichtete Sequenz

Bei der Akquisition der T2 gewichteten Daten erfolgte die Aufzeichnung von 5 Echos je Schicht. Das erste Echo wurde nach 17 ms, die folgenden 4 Echos mit je 26 ms Abstand (43 ms, 69 ms, 95 ms und 121 ms) gemessen. Die Abnahme der SNR zeigte den für die T2 Relaxation typischen Verlauf (s. Abb. 19). Die Kurven der Gruppen mit Resovist®-markierten Fibrin-Implantaten zeigten gerade für U1 und U2 deutlich niedrigere SNR

Werte als Ihre Vergleichsgruppen. Für die späteren Untersuchungszeitpunkte zeigte sich dieser Trend nicht mehr so deutlich (s. Abb. 19 und 20).



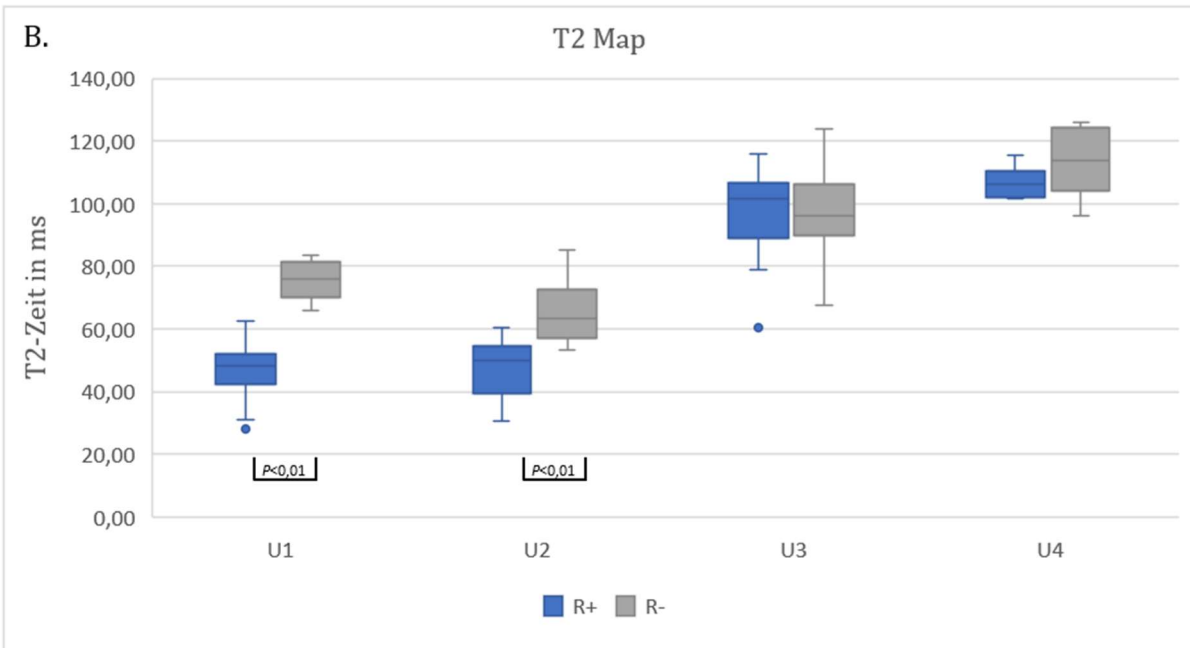
**Abbildung 19: Abnahme des SNR der einzelnen Echos in der T2 Sequenz**

Für U1 und U2 zeigten die Gruppen mit R+ markierten Implantaten (bläuliche Kurven) deutlich niedrigere SNR Werte als die Gruppen mit R- markierten Implantaten (gräuliche Kurven)

Aus den Daten wurden T2-Karten (maps) generiert, die die T2-Zeiten je Pixel in Millisekunden anzeigen. Hier ließen sich signifikante kürzere T2-Zeiten der Resovist®-markierten Implantate im Vergleich zu den Kontrollimplantaten bei den Untersuchungen nach 1 und nach 4 Wochen nachweisen ( $p_{U1} < 0,001$ ;  $p_{U2} < 0,001$ ). Wie schon aus der Darstellung der SNR Verläufe der Echos abzuschätzen, waren die Unterschiede nach 12 und nach 24 Wochen nicht mehr signifikant ( $p_{xU3} = 1,0$ ;  $p_{xU4} = 0,24$ ).

### A. Mittelwerte und Mediane T2

	MW ± SD			Median u. IQR	
R+U1	47,74	±	8,14	48,55	8,48
R- U1	75,36	±	5,68	75,90	11,01
R+U2	47,07	±	9,84	49,90	15,13
R- U2	64,69	±	8,87	63,35	15,32
R+U3	96,69	±	16,37	101,7	97,99
R- U3	97,99	±	14,70	96,25	16,25
R+U4	106,76	±	5,14	106,25	8,72
R- U4	113,38	±	10,92	113,75	19,81

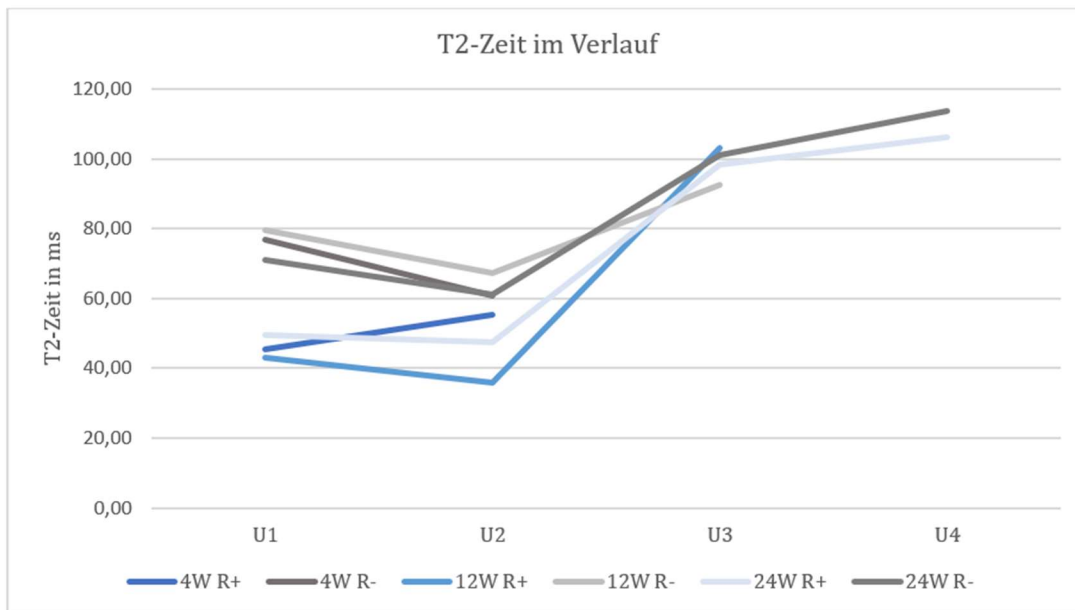


**Abbildung 20: Deskriptive Statistik und Boxplot der T2 Zeiten**

Vergleiche der R+ und R- Gruppen untereinander. Signifikante Unterschiede konnten für U1 und U2 nachgewiesen werden. Mit zunehmender *in vivo* Zeit nahm die T2-Zeit zu.

In der 4W Gruppe zeigte sich zwischen U1 nach 1 Woche und U2 nach 4 Wochen weder für die Tiere mit Resovist®-markierten Implantaten noch für die Gruppe mit unmarkierten Implantaten ein signifikanter Unterschied. Bei der Untergruppe 12W war für beide Gruppen (R+ und R-) der Anstieg der T2-Zeit zwischen der 4. Woche und der 12. Woche signifikant (12WR+:  $p_{xU2-U3}=0,014$ ; 12WR-:  $p_{xU2-U3}=0,04$ ). Die Messungen in der 24W Gruppe ergaben bei den Resovist®-markierten Implantaten einen signifikanten Anstieg der T2-Zeit zwischen U2 und U3 ( $p_{xU2-U3}=0,07$ ) und dem entsprechend auch zu U4 ( $p_{xU2-U4}<0,001$ ). Die Kontrollgruppen wiesen vergleichbare Verläufe mit einem signifikanten T2-Zeit Anstieg zwischen U2 und U3 auf ( $p_{xU2-U3}=0,03$ ). Kumuliert man die Messwerte der einzelnen Messzeitpunkte nach Resovist®-markierten und Resovist®-unmarkierten Implantaten, zeigte sich für die Änderung der T2-Zeit zwischen U1 und U2

im Gegensatz zu den einzelnen Subgruppen 4W, 12W und 24W für die Resovist®-unmarkierten Implantate eine signifikante Reduktion ( $p_{xU1-U2R-} < 0,001$ ).

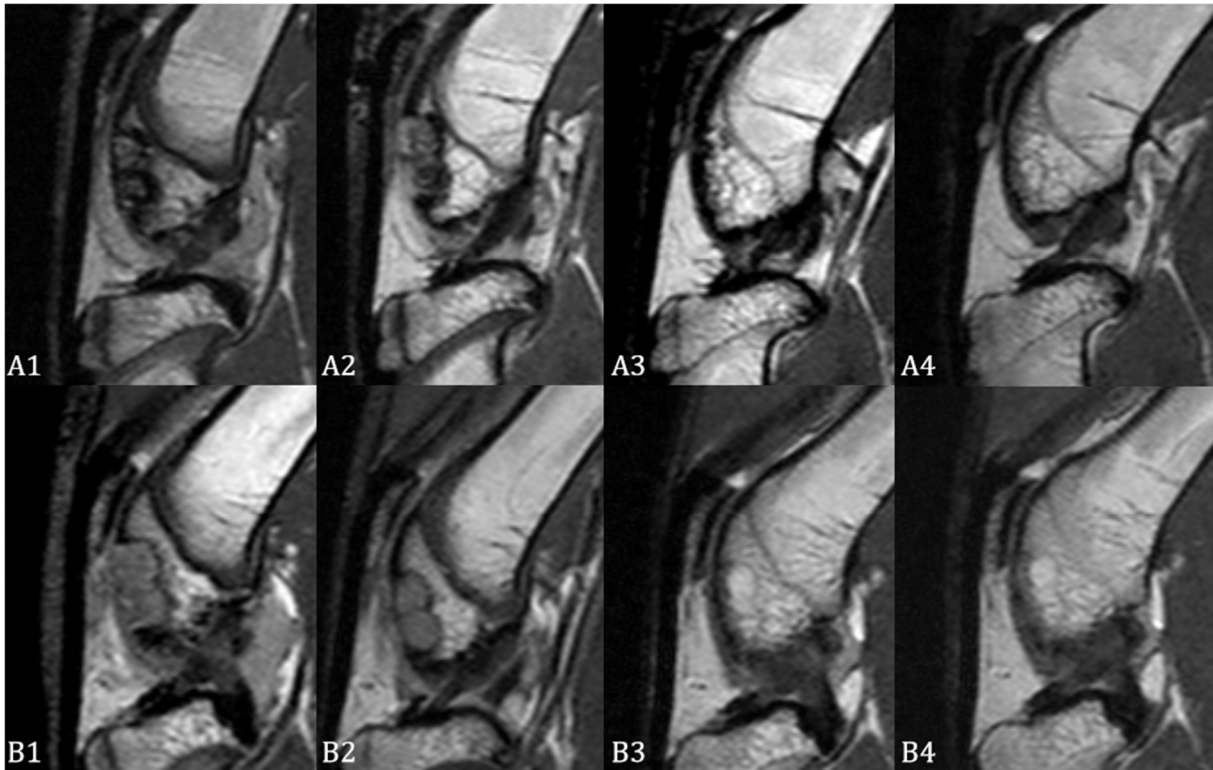


**Abbildung 21: Verlauf der T2-Zeit der Subgruppen**

Außer für die Untergruppe 4W mit Resovist®-haltigen Implantaten sank die T2-Zeit zwischen der 1. und der 4. Woche *post implantationem*. Anschließend stieg die T2-Zeit für die Gruppen bei denen weitere Messungen durchgeführt wurden.

Bildmorphologisch waren die Resovist®-markierten Implantate und die Resovist®-unmarkierten Implantate im Vergleich zum umgebenden Knochen hypointens, wobei diese für die R+ Implantate stärker ausfiel. Mit zunehmender *in vivo* Zeit glichen sich die Implantate der Umgebung an und unterschieden sich bei U4 nicht mehr untereinander (s. Abbildung 22).



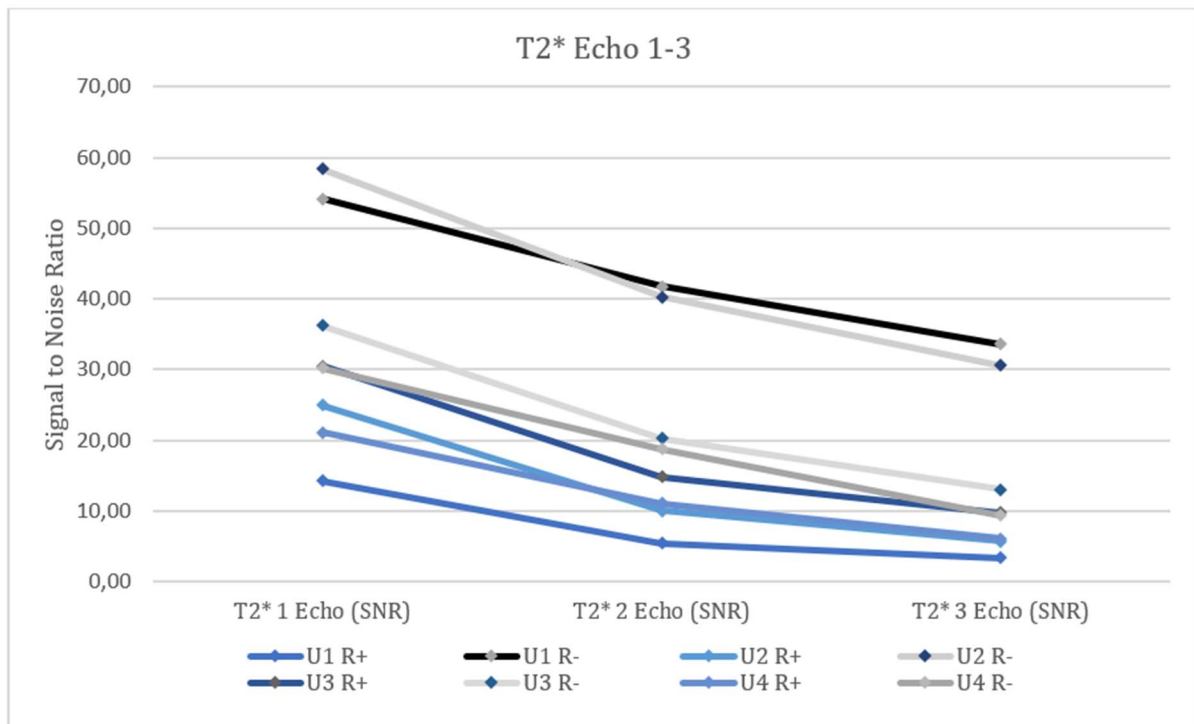


**Abbildung 22: T2-Wichtung: Repräsentative Abbildungen von R+ und R- Implantaten im Verlauf**

Abgebildet ist jeweils das erste Echo nach 17 ms für Resovist<sup>®</sup>-markierte Implantate (Reihe A) und Resovist<sup>®</sup>-unmarkierte Kontrollen (Reihe B). Auch in der T2-Wichtung sorgten die SPIO Partikel für eine deutliche Hypointensität, die besonders am Rand zur Signalauslöschung führte. Dagegen zeigten sich die unmarkierten Implantate homogen.

### 3.6. T2\*-gewichtete Sequenz

Bei der Aufnahme der T2\*-Sequenz wurden drei Echos je Schicht aufgenommen. Nach 4,6 ms wurde das erste Echo gemessen, nach jeweils 6,9 ms folgten das zweite und dritte Echo (11,5 ms und 18,4 ms). Ähnlich wie bei der T2-Sequenz sank die gemessene Signalintensität und damit auch das Signal-zu-Rausch Verhältnis asymptotisch gegen 0. In den Messungen zeigte sich, dass die SNR der Resovist<sup>®</sup>-markierten Implantaten deutlich unterhalb der zugehörigen Vergleichsgruppe mit unmarkierten Implantaten war (s. Abb. 23). Diese Differenz bestand für alle Messzeitpunkte bis 24 Wochen (U4) nach der Operation. Die SNR der Resovist<sup>®</sup>-markierten Implantate stieg mit zunehmender *in vivo* Zeit, die der Resovist<sup>®</sup>-unmarkierten Implantate hingegen sank, bis zur Untersuchung nach 12 Wochen (U3). Anschließend stieg der Median wieder leicht an.



**Abbildung 23: Vergleich der SNR der T2\* Echo 1-3**

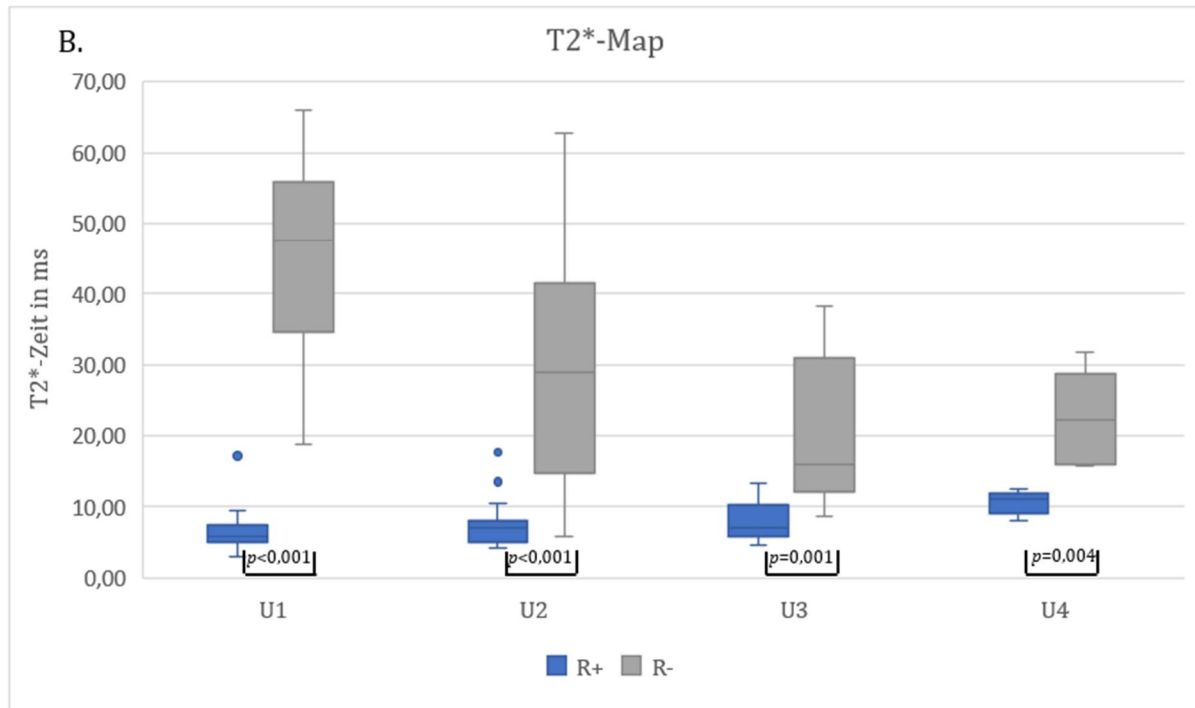
Das Signal-zu-Rausch Verhältnis der Resovist®-markierten Implantate (blaue Linien) lag deutlich unter denen der Vergleichsgruppe (grauschwarze Linien).

Auch aus den T2\* Daten wurden Karten generiert, in denen die T2\*-Zeiten pixelbasiert dargestellt wurden (s. Abb. 26). Die T2\*-Zeiten lagen erwartungsgemäß unter den T2-Zeiten (s. 1.4.). Der Vergleich der Mittelwerte bei der ersten MRT Untersuchung nach einer Woche zeigte den größten Unterschied ( $MW_{R+U1}=6,8\pm 3,13$  ms;  $MW_{R-U1}=45,36\pm 13,08$  ms), auch zu den späteren Messzeitpunkten lagen die T2\*-Zeiten der Resovist®-markierten Implantate deutlich unterhalb der Zeiten der unmarkierten Kontrollen (s. Abb. 23 A und B). In der statistischen Auswertung zeigten sich diese Unterschiede zu allen Messpunkten signifikant ( $p_{U1}<0,001$ ,  $p_{U2}<0,001$ ,  $p_{U3}=0,001$  und  $p_{U4}=0,004$ ).

Bei U1 nach 1 Woche und bei U2 nach 4 Wochen bestand innerhalb der Resovist®-markierten Implantate jeweils ein deutlicher Ausreißer, der auf dasselbe Versuchstier (Nr. 127, R+, 4W) zurückging. Bei der bildmorphologischen Analyse der T2\*-Echos zeigten sich die Implantate, die diesem Ausreißer zugeordnet wurden, im Vergleich zu Vergleichspräparaten derselben Untergruppe hyperintens ohne über dieselbe Signalintensität wie Flüssigkeit zu verfügen. Im Vergleich zu den unmarkierten Implantaten waren sie deutlich hypointens.

### A. Mittelwerte und Mediane T2\*

	MW ± SD			Median u. IQR	
R+U1	6,80	±	3,13	5,80	2,53
R- U1	45,36	±	13,08	47,50	21,23
R+U2	7,40	±	3,56	6,95	2,97
R- U2	29,27	±	15,41	28,92	26,70
R+U3	8,05	±	2,79	7,05	4,45
R- U3	19,84	±	10,45	15,85	10,45
R+U4	10,66	±	1,94	11,1	2,90
R- U4	22,57	±	6,41	22,17	12,83

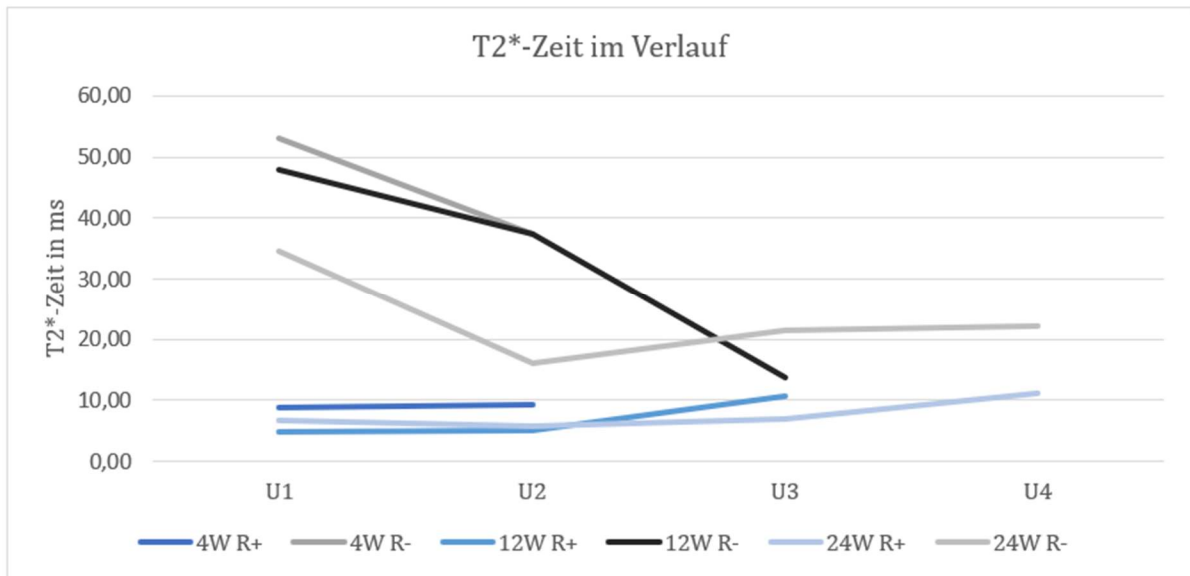


**Abbildung 24: Deskriptive Statistik und Boxplot der T2\* Zeiten**

Im Vergleich zwischen den Resovist®-markierten und den Resovist®-unmarkierten Implantaten zeigten sich signifikant niedrigere T2\*-Zeiten für alle Untersuchungszeitpunkte.

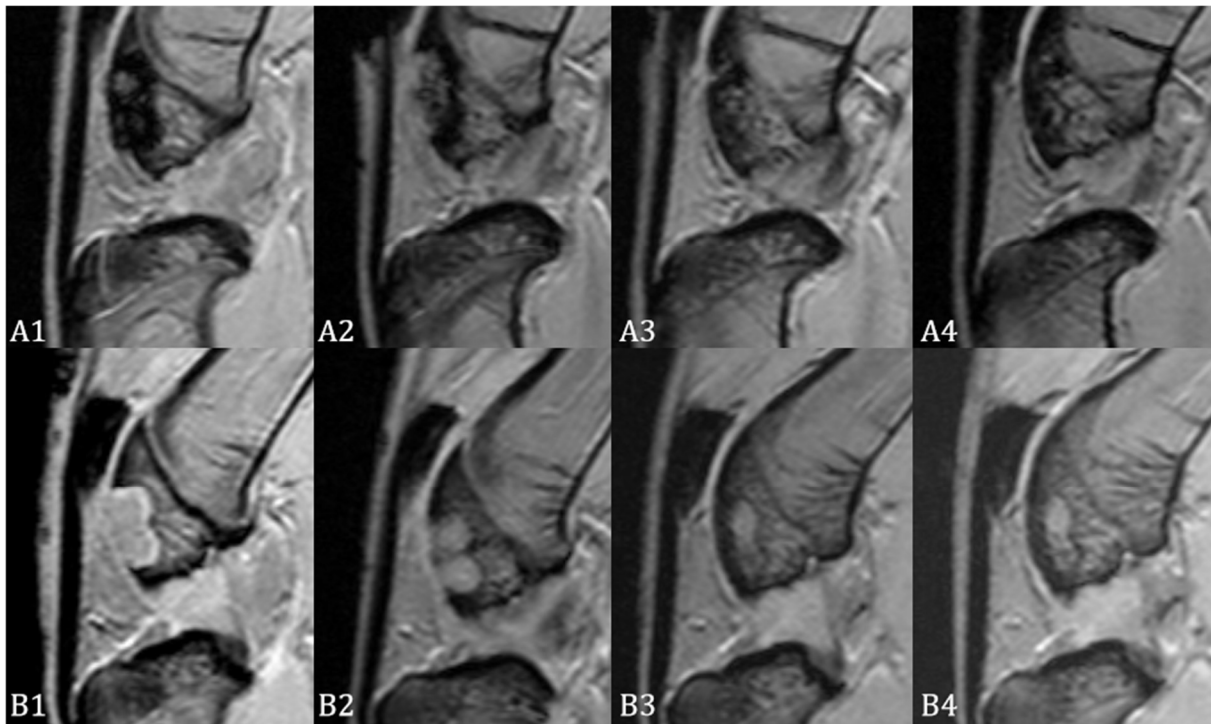
Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der T2\*-Zeiten aufgeteilt in die drei Gruppen 4W, 12W und 24W (s. Abb. 24) so lagen die Zeiten in der 24W Kontrollgruppe unterhalb deren der ersten zwei Gruppen. Auch hatten die Implantate der 24W Gruppe bei der Untersuchung nach 4 Wochen (U2) verhältnismäßig niedrige T2\*-Zeiten. Bei den Resovist®-markierten Implantaten blieben die Zeiten in allen Gruppen von der 1. bis zu 4. Untersuchung konstant niedrig. Eine signifikante Änderung der T2\*-Zeit für die Resovist®-markierten Zellen zeigte sich nur bei der 24W Gruppe für die T2\*-Zeitzunahme zwischen U1 und U4 ( $p_{\text{xU1-U4}}=0,014$ ). In den unmarkierten Kontrollen zeigten sich signifikante T2\*-Zeitänderungen im Intervall zwischen U1 und U2 für die 4W Gruppe ( $p_{\text{U1-U2}}=0,028$ ) und die 24W Gruppe ( $p_{\text{xU1-U2}}=0,01$ ). Die Gruppe 12W hatte einen signifikanten

T2\*-Zeit Verlust zwischen der Untersuchung nach 1 Woche und der nach 12 Wochen ( $p_{U1-U3}=0,011$ )



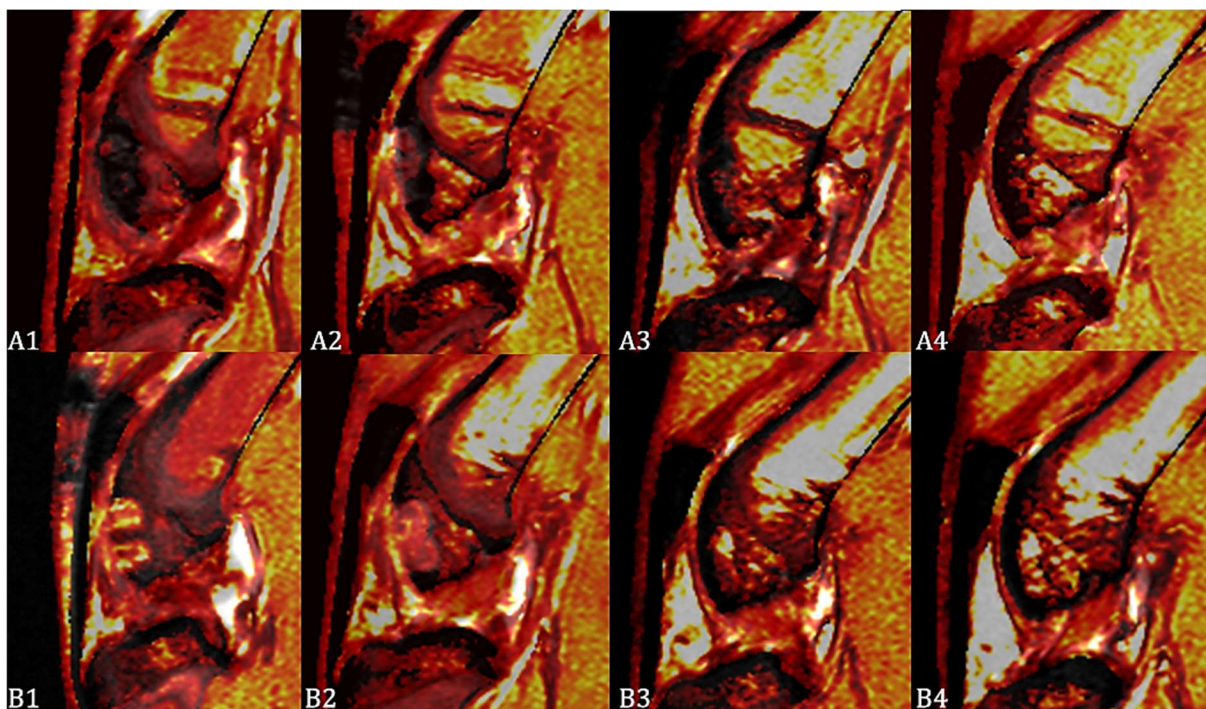
**Abbildung 25: Verlauf der T2\*-Zeit der Subgruppen**

Die Verläufe der T2\*-Zeiten der Resovist-markierten Implantate waren bis zur 4. Woche (U2) nahezu horizontal und stiegen dann langsam an. Die unmarkierten Kontrollen hatten zwischen U1 und U2 stark fallende T2\*-Zeiten.



**Abbildung 26: T2\*-gewichtete Sequenz, repräsentative Abbildung für R+ und R- Implantate**

Gezeigt ist jeweils das 1. Echo nach 4,6 ms für Resovist®-markierte Implantate (Reihe A) und Resovist®-unmarkierte Implantate (Reihe B). Auffällig ist das *Blooming Artefakt* bei A1. Die Kontrollimplantate waren im Gegensatz zu den anderen Sequenzen hyperintens. Auch bei Bildern der Untersuchung nach 12 (A3) und 24 Wochen (A4) waren Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle (B3 u. 4) zu erkennen.



**Abbildung 27: T2\*-Maps, repräsentative Abbildung für R+ und R- Implantate**

Die deutlich höheren T2\*-Zeiten der Kontrollimplantate (B1-4) sind durch hellere Pixelwerte dargestellt.

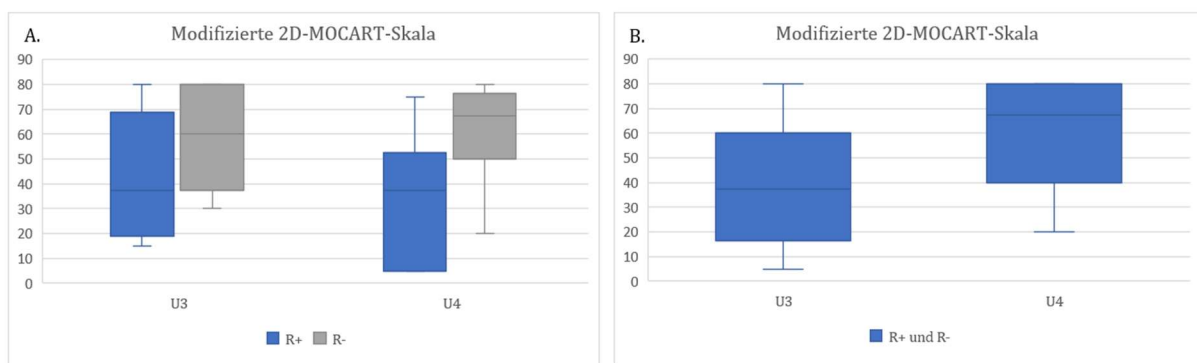
### **3.7. Bildmorphologische Untersuchung**

Die Auswertung der modifizierten 2D-MOCART 2.0 Skala ergab für die Untersuchung U3 nach 12 Wochen *in vivo* Zeit einen Median von 37,5 mit einem IQR von 44. Nach Verdopplung der Regenerationszeit war der Median bei der Untersuchung 4 auf 67,5 mit einem IQR von 40 gestiegen. Der Unterschied war signifikant ( $p_{U3-U4}=0,003$ ). Die schmalere IQR nach 24 Wochen wies eine etwas homogenere Verteilung nach. Insgesamt konnte nach 12 Wochen ein Kniegelenk mit der Höchstpunktzahl von 80 bewertet werden. Nach 24 Wochen war dies für vier Kniegelenke möglich (33%). Eine Verschlechterung zwischen U3 und U4 trat in keinem Fall auf. In den Untergruppen zeigten sich bis auf die Unterkategorien „Erguss“ und „subchondraler Knochen“ ebenfalls signifikante Änderungen zwischen der U3 und der U4 (s. Tabelle 4.). Ein Vergleich zwischen den Resovist®-markierten und den unmarkierten Implantaten ergab für das Gesamtergebnis bei beiden Messzeitpunkten keinen signifikanten Unterschied ( $p_{xGesamtU3}=0,589$ ,  $p_{xGesamtU4}=0,818$ ). Auch für alle Unterkategorien, die in der modifizierten 2D-MOCART 2.0 Skala bewertet wurden, fand sich übereinstimmend zur Gesamtbewertung kein signifikanter Einfluss einer Resovist®-Markierung.

	Median / Interquartilbereich		Signifikanz U3-U4
	Untersuchung 3	Untersuchung 4	
Grad der Defektfüllung	10/ 10	20/8	$p=0,104$
Integration des Ersatzgewebes	7,5/13	15/10	$p=0,011$
Oberfläche	5/9	10/5	$p=0,025$
Erguss	7,5/5	7,5/10	<u>n.s.</u>
Struktur	0/0	5/5	$p=0,025$
Signalintensität	5/5	10/5	$p=0,002$
Subchondraler Knochen	5/5	5/5	<u>n.s.</u>
Gesamtergebnis	37,5/44	67,5/40	$p=0,003$

**Tabelle 3: Median und IQR der modifizierten MOCART 2.0 Skala**

Insgesamt konnten maximal 80 Punkte erreicht werden. Je mehr Punkte erreicht wurden, desto besser war die Regeneration zu bewerten. Mit zunehmender *in vivo* Zeit wurde eine höhere Gesamtpunktzahl erreicht.



**Abbildung 28: Vergleich der Gesamtergebnisse der modifizierten MOCART 2.0 Skala**

A.) Vergleich zwischen den Kniegelenken, die Resovist®-markierte MSC enthielten und den Kontrollen.

B.) Vergleich unabhängig der Zellmarkierung

Insgesamt war eine Maximalpunktzahl von 80 möglich. Signifikanz bestand zwischen U3 und U4, jedoch nicht zwischen Resovist®-markierten und unmarkierten Implantaten zu einem Untersuchungszeitpunkt.

## 4. Diskussion

In der durchgeführten experimentellen Studie konnte gezeigt werden, dass die Markierung allogener, mesenchymaler Stammzellen mit dem Eisen-Kontrastmittel Resovist®, in den MRT-Untersuchungen zu einem signifikanten Abfall des Signal-zu-Rausch Verhaltens (SNR - *signal to noise ratio*) im Vergleich zu unmarkierten Zellen führt. Abhängig von der angewendeten MRT-Sequenz gelang dies bis zu einer *in vivo* Zeit von 24 Wochen.

Hierzu wurden mesenchymale Stammzellen in Fibrin-Implantate eingebettet. In der Hälfte der Implantate befanden sich Zellen, die mit Resovist® markiert wurden und in der anderen Hälfte Zellen, die als unmarkierte Kontrolle dienten. Diese Implantate wurden im Tiermodell in operativ gesetzte osteochondrale Defekte der Trochlea femoris eingesetzt und im MRT bis zu 24 Wochen nachbeobachtet.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit der Einfluss der Zellmarkierung auf die Defektheilung, im Sinne einer bildmorphologischen Veränderung bzw. ausbleibenden Defektheilung, zwischen Resovist®-markierten und unmarkierten Implantaten untersucht und die Reaktion des Kniegelenks auf den operativen Eingriff beurteilt.

### 4.1. Tiermodell

In dieser Arbeit kamen Kaninchen der Rasse „*New Zealand White*“ (NZW) zum Einsatz. Experimentelle Studien, die Knorpeldefekte oder Methoden der Knorpelregeneration an NZW-Kaninchen untersuchen, sind zahlreich durchgeführt worden (Abbas et al., 2018, Abs. 2.5; Aulin et al., 2013, S. 59; Papacrhistou et al., 1997, S. 132). Vorteile dieses Tiermodells sind die Verfügbarkeit genotypisch identischer Versuchstiere, die einfache und kosteneffiziente Haltung und die oben angesprochene große Zahl an Vergleichsstudien in der Literatur. Die Knorpeldicke des Femurs von Kaninchen wird in der Literatur mit 0,21-0,46mm angegeben (D. Frisbie et al., 2006, S. 145) und ist somit um ein Vielfaches dicker als der Knorpel von Kleintieren wie Mäusen (0,058mm) und Ratten (0,072mm) (Stockwell, 1971, S. 413). Daher sind sie als Modell für osteochondrale Therapien deutlich besser geeignet. Auch zählt die Trochlea femoris aufgrund der Anatomie des Kaninchens zu den Belastungszonen des Kniegelenks (Chu et al., 2010, S. 107) und ist somit als Implantationsort gut geeignet, da osteochondrale Läsion häufig in den Belastungszonen liegen (Pelletier et al., 2007, S. 4). Besonders die MRT-Bildgebung

profitiert von der dickeren Knorpelschicht, da eine bessere Auflösung erreicht werden kann und somit eine bessere morphologische Beurteilung möglich ist. Zudem ist aufgrund der größeren Kniegelenke der operative Eingriff deutlich präziser durchzuführen. Der Kniegelenksknorpel von Ziegen oder Schweinen wäre mit einer Dicke von 0,7-1,5mm (Chu et al., 2010, S. 110) dem Menschen (1,69-2,55mm)(Sheperd & Seedhorn, 1999, S. 29) noch vergleichbarer, jedoch sind Studien mit einer ausreichenden Fallzahl aufgrund der aufwendigen Tierhaltung und Beschaffungskosten dieser Tiere schwer zu realisieren. Nachteilig ist jedoch, dass bei Kaninchen eine hohe Selbstheilungsrate von Knorpeldefekten abhängig des Tieralters beschrieben wurde (Wei et al., 1997, S. 68-9). Zum anderen sind spezifische MRT-Spulen für die Gelenkgröße nicht verfügbar und man kann nicht die gleiche räumliche Auflösung wie beim Menschen erreichen (J. C. Goebel et al., 2010, S. 189). Zusammengefasst ist das verwendete Tiermodell für die Untersuchung der Anwendbarkeit der zellulären MRT in einer frühen Phase der präklinischen Erprobung gut geeignet und etabliert.

#### **4.2. Einfluss der Operationsmethode auf das Kniegelenk in Abhängigkeit der Zellmarkierung**

Die Implantation der MSC-Fibrin-Implantate erfolgte über eine mediale Arthrotomie als Zugangsweg in artifizuell gebohrte osteochondrale Defekte. Bei der Operation kam ein spezieller Keramikbohrer zum Einsatz, um Metallartefakte durch Abrieb in den MRT-Untersuchungen auszuschließen. Betrachtet man die Größe des Kniegelenks eines NZW Kaninchen und die Größe des Defekts, der aus zwei Zylindern mit einem Durchmesser von je 3,6mm und einer Tiefe von 3mm bestand, so ist es durchaus als invasiver Eingriff zu sehen, der auch Auswirkungen auf den umgebenden Knochen sowie die Weichteile (Schleimhaut) und die Gelenkflüssigkeit hat. Daher wurden das Knochenödem, die Synovialisdicke und der Gelenkerguss als Parameter für den postoperativen Verlauf untersucht.

Für das Knochenödem zeigte sich eine Signalerhöhung im Knochen knapp neben der Defektstelle im Vergleich zur Femur-Diaphyse um den Faktor 2. Bis zur 12. postoperativen Woche war eine Normalisierung des Knochenödems nachzuweisen. Ein Unterschied zwischen Tieren, die Resovist®-markierte und Tieren, die unmarkierte Implantate eingesetzt bekommen hatten, bestand bei keiner Untersuchung. Das spricht für eine gute Erholung des Knochens von dem Eingriff. Zum Vergleich demonstrierten



Glenn et al. (2006, S. 1090) nach Transplantation von osteochondralen Auto- und Allografts (4,5mm Durchmesser, 10mm Tiefe) in Kniegelenke im Hundemodell nach 3 Monaten ein persistierendes Knochenödem bei 14 von 18 Tieren. Nach 6 Monaten bestand nur noch bei 1 von 18 Tieren ein Knochenödem.

Bei der Messung der Synovialisdicke stellte sich zwischen der Untersuchung nach einer Woche und der Untersuchung nach vier Wochen kaum eine Veränderung dar (U1: 2,35mm, U2: 1,95mm). Im Verlauf konnte ein gleicher Rückgang in der Resovist®- und der Kontrollgruppe auf 0,35mm im Median nach 24 Wochen gemessen werden. Die angewandte Messmethode hat durchaus ihre Einschränkungen, wenn es um die Beurteilung der Synovialmembran geht, da für eine genauere Beurteilung der Synovialis eine kontrastmittelverstärkte Untersuchung gängig ist. Untersuchungen ohne Kontrastmittel sind aber in der Literatur auch vorhanden (Fernandez-Madrid et al., 1995, S. 178). Für eine nebenbefundliche Analyse kann sie aber einen guten Eindruck für den Verlauf ihres Volumens, und damit Rückschlüsse auf die Reaktion des Knies auf die Operation vermitteln.

Die Beurteilung des Kniegelenksergusses zeigte eine breite Streuung in den ersten zwei Untersuchungen. So war bei der U1 das maximal gemessene Volumen um den Faktor 5,7 größer als das kleinste gemessene Volumen. Bei der Untersuchung 2 war der Unterschied sogar ein Faktor von 9,9 bei jedoch kleinerem Maximalwert. Die breite Streuung der Volumina könnte zum einen als unterschiedliche Reaktion verschiedener Individuen angesehen werden, zum anderen handelte es sich um Versuchstiere, bei denen keine postoperative Ruhigstellung erfolgen konnte, und die sich auch im Verhalten zwischen den Untersuchungen deutlich unterschiedlich verhielten.

Ein Einfluss der Resovist®-Markierung auf den Kniegelenkserguss konnte zu keinem Untersuchungszeitpunkt gezeigt werden.

Nach 12 und 24 Wochen waren die Ergussvolumina deutlich kleiner, jedoch noch immer über den Kontrollmessungen nicht operierter Kniegelenke. Amiel et al. (2003, S. 639) beschrieben in einem Kaninchenmodell nach Durchtrennung des vorderen Kreuzbandes einen Gelenkerguss 26 Wochen postoperativ bei allen behandelten Tieren.

Auch wenn eine direkte Übertragung der Ergebnisse nicht möglich ist, scheint ein moderater Erguss als anhaltende Reaktion auf die Operation bzw. die Umbauvorgänge im osteochondralen Defekt als Normalverlauf bewertet werden zu können. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Operation von den Versuchstieren gut

vertragen wurde. Keines der Tiere musste aufgrund der vordefinierten Abbruchkriterien euthanasiert werden.

### **4.3. Messergebnisse der Implantate**

Ob morphologische Untersuchungsergebnisse der MRT Bildgebung einen sicheren Rückschluss auf die Ergebnisse der klinischen Anwendung von Knorpeltherapien zulassen, ist nicht bewiesen (de Windt et al., 2013, S. 6). Genau hier kann die in der vorliegenden Arbeit untersuchte zelluläre MRT ein weiterer Baustein zum Monitoring und der *in vivo* Evaluation neuer zellbasierter Therapien werden.

Um die Stammzellen im MRT zu visualisieren, wurden sie mit Resovist® markiert (siehe 2.2.2). Dieses Verfahren wurde bereits erfolgreich in einem Tiermodell mit Ratten verwendet. Henning et al. (2012, S. 204-6) konnten eine Änderung des SNR der implantierten Zellen über 12 Wochen nachweisen. Auch andere experimentelle Studien verwendeten SPIO gelabelte MSC *in vivo* zum Zell-Monitoring z.B. im Schweinemodell (Parashurama et al., 2016, S. 826) oder Kaninchenmodell (Jing et al., 2008, S. 435).

Wie in 3.1. beschrieben, stellten sich bei einem Tier bei U2 und bei 3 Tieren der U3 die Defekte gänzlich mit Flüssigkeit gefüllt dar. Daher war eine valide Messung des SNR nicht möglich und die Untersuchungen wurden für die Auswertung nicht berücksichtigt.

Auffällig war, dass der Defekt, der bei der U2 noch ausgeschlossen werden musste, bei der U3 mit Gewebe, das den anderen Defektfüllungen entsprach, gefüllt war. Für die Defekte, die bei U3 mit Flüssigkeit gefüllt waren, konnte ein weiterer Verlauf aufgrund des Studiendesigns nicht untersucht werden. Daher ist nicht auszuschließen, dass sich auch in diesen Defekten mit der Zeit Regeneratgewebe gebildet hätte. Als Ursache für die fehlende Bildung des Regeneratgewebe bei diesen Defekten ist eine Zelllyse durch Apoptose oder Nekrose in Betracht zu ziehen. So beschrieben Steinert et al. (2007, S. 7) als Grund für den Zelluntergang die Freisetzung von unter anderem Cytokinen wie IL-1 und TNF- $\alpha$ , von Glukokortikoiden und mechanischem Stress bei Zellen, die in osteochondrale Defekte transplantiert wurden. Auch Daldrup-Link & Nejadnik (2014, S. 2-14) publizierten ein - im MRT gleichartig aussehendes - Verlust von transplantierten Stammzellen im Tiermodell und vermuteten Apoptose aus oben genannten Gründen.

Bei fehlenden äußerlichen Infektzeichen der Versuchstiere war eine Infektion unwahrscheinlich. Eine makroskopische und vor allem histologische Beurteilung der Defektareale könnte hier weitere Erkenntnisse liefern, war jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit.

Da kein Regeneratgewebe mehr nachzuweisen war, müsste das intrazelluläre Resovist® in diesen Defekten frei geworden sein. Ein Nachweis von hypointensen Bereichen im Kniegelenk ließ sich jedoch nicht darstellen. Das freigewordene Resovist® könnte zusammen mit den apoptotischen Zellen durch Makrophagen phagozytiert und abtransportiert worden sein. Dieser Effekt konnte bereits in anderen Studien bewiesen werden (Amsalem et al., 2007, S. 41; Nejadnik et al., 2016, S. 4).

#### **4.3.1. PD SPIR Sequenz**

Ein Vorteil der Protonendichte gewichteten Aufnahme ist, dass sie neben der hohen Sensitivität für SPIO eine gute Sensitivität und Spezifität für die Diagnostik von chondralen Läsionen hat (Verstraete et al., 2004, S. 675). Somit kann man nicht nur die markierten Zellen detektieren, sondern auch das gebildete Regeneratgewebe zuverlässig beurteilen.

In der Protonendichte gewichteten Aufnahme zeigten die Resovist®-markierten Implantate vor allem eine Woche *post implantationem* eine deutlich niedrigere SNR als die Vergleichsimplantate. Diese waren im Vergleich zum Knochen hyperintens, wohingegen sich die Resovist®-markierten Implantate iso- bis hypointens darstellten. Aufgrund des hohen Wassergehaltes des für die Herstellung der Implantate verwendeten Fibrins, müssten sich die Implantate hyperintens, wie bei den Kontrollpräparaten gezeigt, darstellen. Die Abschwächung der SNR in der Resovist®-markierten Gruppe muss daher durch die SPIO verursacht worden sein. Mit zunehmender *in vivo* Zeit nahm die SNR der markierten Implantate zu und die der unmarkierten Kontrollen ab. Bei der Untersuchung U2 waren die Unterschiede der SNR noch signifikant. Die deutliche Hyperintensität der Kontrollen war auch bildmorphologisch darstellbar. 12 Wochen nach der Untersuchung lag die SNR im Median auch noch höher als die der Resovist®-markierten Implantate, aber der Unterschied war nicht mehr signifikant. Bei der letzten Untersuchung nach 24 Wochen konnte kein Unterschied mehr zwischen der SNR der zwei Gruppen festgestellt werden. Der signifikante Einfluss von Resovist® auf die Protonendichte gewichtete Sequenz in den ersten zwei Untersuchungen deckt sich auch mit den Ergebnissen anderer Autoren. So beschrieben Lucidarme et al. (2003, S. 472) eine hohe Sensitivität der PD Sequenz nach Gabe von SPIO in der Leber mit einer guter SNR. In einer Studie von Yamashita (1996, S. 321) wurde die Reduktion der SNR im Lebergewebe nach Applikation von 10µmol Fe/kg in verschiedenen MRT Sequenzen gemessen. Hier zeigte sich die PD gewichtete Sequenz den anderen (T1- und T2-gewichtet) überlegen. Eine

Vergleichsstudie, die SPIO-markierte MSC ebenfalls über einen längeren Zeitraum in der PD-Sequenz beobachten, liegt in der aktuellen Literatur nicht vor. In der vorliegenden Arbeit ließ sich ein Trend darstellen, dass die Resovist®-markierung auch nach 12 Wochen noch zu einer merklichen Hypointensität gegenüber den Kontrollen führt. Ob eine längere Detektion sicher möglich ist, sollte durch weitere Studien überprüft werden. Zu beachten ist die niedrigere Anzahl an eingeschlossenen Versuchstieren zum Zeitpunkt U3, da nach der U2 bereits ein Drittel der Versuchstiere für die histologische und molekularbiologische Untersuchung sakrifiziert werden musste. Dies gilt auch für die folgende Diskussion der anderen Sequenzen.

#### **4.3.2. T1-gewichtete Sequenz**

Ähnlich wie bei der zuvor beschriebenen Sequenz stellte sich in der T1-Wichtung bei den ersten zwei Untersuchungen nach 1 und nach 4 Wochen die SNR der Resovist®-markierten Implantate im Vergleich zu den Kontrollimplantaten im Mittelwert erniedrigt dar. Im Gegensatz zur PD-Sequenz konnte jedoch zu keinem Untersuchungszeitpunkt ein signifikanter Unterschied gezeigt werden. Im zeitlichen Verlauf hingegen war mit zunehmender *in vivo* Zeit auch eine zunehmende SNR gegeben. Dies traf sowohl auf die Resovist®-markierten als auch auf die unmarkierten Implantate zu. Der Hauptanstieg der SNR für die Resovist®-markierten Implantate lag zwischen der 4. und 12. Woche und betrug etwa 100%. Anschließend ließ sich über die nächsten 12 Wochen nur noch eine geringe weitere Erhöhung belegen. Auch für die unmarkierten Implantate war die Zeitspanne zwischen U2 und U3 diejenige mit dem größten Unterschied im Signal-zu-Rausch Verhältnis, wenn auch nicht ganz so stark ausgeprägt wie in der anderen Gruppe. Es fiel auf, dass die Implantate beider Gruppen bei der U3 nahezu identische SNR Werte hatten, und diese nach 24 Wochen beibehalten hatten. In den MRT-Bildern stellten sich die markierten Implantate zu Beginn in der T1-gewichteten Sequenz deutlich hypointens dar, die Implantate mit unmarkierten Stammzellen erschienen dagegen isointens zu Muskelgewebe und dem Gelenkerguss. Zählen die SPIO Kontrastmittel generell zu den die T2-Zeit beeinflussenden Kontrastmitteln, so haben sie auch einen Einfluss auf die T1-Relaxation. Müller et al. (1998, S. 229-31) zeigten am Phantom einen dosisabhängigen T1-Effekt. So war bei niedrigen Eisenkonzentrationen eine Erhöhung der Signalintensität zu beobachten, bei höheren Konzentrationen dagegen ein negativer Effekt. Zusätzlich wurden die Messergebnisse durch die gewählte TE-Zeit beeinflusst. Der beschriebene

Einfluss auf die T1-Zeit wird aufgrund der deutlich niedrigeren T1-Relaxivität im Vergleich zur T2-Relaxivität von Resovist® als geringer eingeschätzt (Taupitz et al., 2003, S. 754). Dies entspricht den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, da in den frühen Messungen ein Unterschied – wenn auch nicht-signifikant- gezeigt werden konnte. Da in der T1-Wichtung Flüssigkeiten eher hypointens sind, ist der gemessene Signalanstieg möglicherweise über die Zeit durch eine Abnahme des Flüssigkeitsanteils im Implantat bzw. der Bildung von Regeneratgewebe zu erklären.

### **4.3.3. T2-gewichtete Sequenz**

Der Einfluss der Resovist®-Markierung auf die Ergebnisse in der T2 Wichtung war im Sinne einer T2-Zeit Verkürzung, in den ersten zwei Untersuchungen signifikant. Nach 12 Wochen jedoch war die gemessene T2-Zeit im Median höher als die der Resovist®-negativen Kontrollen. Zudem war die T2-Zeit beider Gruppen zwischen der 4. und der 12. Woche signifikant angestiegen. Die gemessenen T2-Zeiten lagen für die Kontrollgruppe bei der ersten Untersuchung bei  $75,36 \pm 5,68$  ms und bei der zweiten Untersuchung bei  $64,69 \pm 8,87$  ms. Watanabe et al. (2009, S. 1344) berichteten in ihrer Studie über gemessene T2-Zeiten von  $51,2 \pm 5,8$  ms für Regeneratgewebe, welches sich nach Mikrofrakturierung an osteochondralen Defekten gebildet hat. Da nach 1 bzw. 4 Wochen noch ein hoher Wasseranteil in den Implantaten war, scheinen die Messwerte dieser Arbeit valide. Auch spricht der Trend, der sich zur U2 mit einer niedrigeren T2-Zeit zeigt, für einen Verlust von Wasser und einen beginnenden Umbau. Die niedrigeren T2-Zeiten für die Resovist®-markierten Implantate zur jeweiligen Untersuchung ließen den negativen Kontrastmittel-effekt vermuten, der zu einer signifikanten Hypointensität führte.

Auffällig waren die Messwerte der T2-Zeit nach 12 und 24 Wochen postoperativ. Zum einen besteht kein Unterschied mehr zwischen den Gruppen, zum anderen liegen die gemessenen Zeiten deutlich über anderen publizierten T2-Zeiten für Knorpelgewebe und/oder Regeneratgewebe (David-Vaudey et al., 2004, S. 676-8; Watanabe et al., 2009, S. 1344). Nissi et al. (2004, S. 560) maßen jedoch an Schweineknieen durchschnittliche T2-Zeiten um 128 ms bei fortgeschrittenen Knorpeldefekten. Liu et al. (2016, S. 4) führten ein T2-Mapping an Kaninchenknie durch, die durch die Resektion des vorderen Kreuzbandes einen zunehmenden Knorpelschaden bekamen. In wöchentlichen MRT-Untersuchungen stiegen die T2-Zeiten an. 6 Wochen nach durchgeführter Operation lagen sie bei ca. 90 ms. Ähnliche T2-Zeiten sind auch bei Tao et al. (2015, S. 398) für

Regeneratgewebe nach Mikrofrakturierung der Trochlea femoris im Kaninchenmodell beschrieben. Nimmt man dies als Grundlage, sprächen die von uns gemessenen hohen T2-Zeiten für ein sich ausbildendes Regeneratgewebe.

Grundsätzlich ist es schwierig, Relaxationszeiten verschiedener Studien zu vergleichen, da sie von einer Vielzahl an Faktoren beeinflusst werden. So demonstrierte Keinan-Adamsky et al. (2006, S. 537) an Knorpelknochen-Zylindern von Schweinen den Einfluss des Alters der Versuchstiere bei Entnahme, sowie die Ausrichtung im Scanner auf die T2-Zeit. Für Präparate von neugeborenen Tieren lag sie noch bei  $110 \pm 5$  ms, dagegen zeigte die Messung nach 5,5 Monaten eine T2-Zeit von  $52 \pm 7$  ms.

#### **4.3.4. T2\*-gewichtete Sequenz**

Die deutlichsten Unterschiede, die auch über den längsten Zeitraum anhielten, waren in der T2\*-gewichteten Sequenz zu beobachten. Über die kompletten 24 Wochen waren die T2\*-Zeiten der Resovist®-markierten Implantate signifikant niedriger als die der Kontrollgruppe. Zwar näherten sich auch in dieser Sequenz die Zeiten mit längerer *in vivo* Zeit an, so waren die T2-Zeiten bei der U4 im Median immer noch um den Faktor 2 länger. Bei der U1 war es sogar ein Faktor  $> 6$ , um den sich die T2\*-Zeit in den markierten Implantaten verkürzt zeigten. Auffällig waren der durchweg kleine Interquartilabstand (IQR) der Resovist®-markierten Implantate. Eine Erklärung könnte in der Erstellung der Maps liegen. Sofern aufgrund hoher Suszeptibilitätsartefakte für einen Pixel keine T2\*-Zeit bestimmt werden konnte, wurde sie auf den Wert „-2“ gesetzt. In der Messung der ROI wurde dieser Wert jedoch nicht berücksichtigt. Die „wahre“ T2\*-Zeit könnte demnach noch kürzer sein. Führt man sich noch einmal den physikalischen Hintergrund vor Augen, so ist die T2- respektive die T2\*-Zeit der Zeitpunkt, an dem die ursprüngliche Signalintensität auf 37% abgefallen ist. Ist dieser Zeitpunkt vor dem ersten Echo, liegt die gemessene Signalintensität im Bereich des Rauschens und kann nicht richtig ausgewertet werden (Henning et al., 2009a, S. 168; Robson et al., 2003, S. 828-34). Ansätze zur Verbesserung dieses Problems werden später noch erörtert.

Die Messzeiten der Kontrollimplantate zeigten zu Beginn nach 1 Woche T2\*-Zeiten, die im Mittel bei  $45,36 \pm 13,03$  ms lagen. Mamisch et. al. (2012, S. 291) wiesen für Knorpelgewebe nach, dass die T2\*-Zeit etwa 50% der T2-Zeit ist. Nimmt man eine T2-Zeit für Flüssigkeiten von etwa 100 ms an (Souza et al., 2014, S. 1396) entsprechen die Messwerte einem hohen Wassergehalt in den Implantaten. Auch eigene Messungen (nicht

veröffentlicht) für T2- und T2\*-Zeiten in den T2- und T2\*-Maps mit einer ROI im Gelenkerguss waren damit im Einklang. Für die Bildung von Regeneratgewebe sprach die Abnahme der T2\*-Zeit in den Kontrollimplantaten. Betrachtet man die Zeiten nach 12 Wochen (U3) mit einem Median von 15,85 ms (IQR 10,45 ms) sowie nach 24 Wochen (U4) mit einem Median von 22,17 ms (IQR 12,83 ms), so kommt man in den Bereich der osteochondralem Gewebe entspricht. Mamisch et al. (Mamisch et al., 2012, S. 290-1) zeigten an humanen Kniegelenken nach Mikrofrakturierung T2\*- Zeiten von  $18,4 \pm 5,7$  ms für das Regenerationsgewebe in Knochennähe und  $20,1 \pm 3,1$  ms an der Oberfläche. Für gesunden Knorpel waren bei ihnen die T2\*-Zeiten mit  $19,2 \pm 3,5$  ms in der tiefen und  $26,4 \pm 3,6$  ms an der oberflächlichen Knorpelregion etwas länger.

Dass die T2\*-Zeiten auch nach 24 Wochen noch deutlich unter den Zeiten der Kontrollgruppe, als auch unter publizierten T2\*-Zeiten für Regeneratgewebe liegen, lässt das Vorhandensein der SPIO vermuten.

#### **4.3.5. Schlussfolgerung und Beurteilung der Implantat Messungen**

Wie in den vorangegangenen Punkten 4.3.1. - 4.3.4. erörtert, ließen sich in der T2\*-gewichteten GRE-Sequenz die stärksten Unterschiede in den Messwerten nachweisen. Diese Sequenz war die einzige der in dieser Arbeit durchgeführten Sequenzen, in der ein signifikanter Unterschied zwischen den Resovist<sup>®</sup>-markierten und den unmarkierten Implantaten bis zur 24. Woche *post implantationem* nachgewiesen werden konnte. In der Frühphase bis zur 4. Woche zeigten auch die PD-Sequenz sowie die T2-Sequenz signifikante Ergebnisse. Dies ist konkordant zu den Ergebnissen von Lucidarme et al. (2003, S. 470), die für die T2\*-gewichtete GRE-Sequenz bei der Detektion von Leberläsionen mittels SPIO Markierung die höchste Sensitivität ermittelten, die PD-Sequenz jedoch nur geringfügig unterlegen beschrieben.

In der frühen Phase, besonders bei der Untersuchung nach einer Woche fielen die *Blooming Artefakte* in der T2\*-gewichteten Sequenz auf. Diese könnten bei der Beurteilung des Implantats nachteilig sein. Zudem sorgen hohe Suszeptibilitätsartefakte für eine sehr starke Signalauslöschung. Um diese Nachteile abzumildern oder gänzlich aufzuheben sind viele Verfahren in der Erforschung, die man generell in zwei Kategorien einteilen kann. Zum einen wird versucht den „negativen“ Kontrastmitteleffekt, also die verstärkte Signalauslöschung, durch veränderte Pulsfrequenzen in einen „positiven“ Effekt umzuwandeln. Hierbei werden durch veränderte Schichtgradientenechos bei der

Dephasierung des Spins Feldinhomogenitäten erzeugt, die Suszeptibilitätsartefakte hell erscheinen lassen. Diese Methode ist als *Gradient echo Acquisition for Superparamagnetic Particles* (GRASP) bekannt (Mani et al., 2006, S. 127; Seppenwoolde et al., 2003, S. 789; Tyler et al., 2007, S. 286-7). Der andere Weg setzt im *postprocessing* der akquirierten Daten an. Bei dieser Methode werden aus den aus GRE-Sequenzen gewonnenen Rohdaten des K-Raums, also der Daten-Matrix, aus der mittels Fouriertransformation Bilder erstellt werden, über mathematische Funktionen Bilder oder Maps berechnet, die einen positiven Kontrast von SPIO darstellen (Reichenbach et al., 1997, S. 266; Zhao et al., 2011, S. 471). In allen Sequenzen zeigten die Resovist®-markierten Implantate die Hypointensität hauptsächlich am Rand und am Boden des Fibrinimplantats. Geht man davon aus, dass sich zu diesem frühen Zeitpunkt die SPIO intrazellulär befinden, spricht das für eine Zellmigration zum Rand des Implantats hin. Der gleiche Effekt wurde bereits von Berninger et al. (2019, S. 6-7) publiziert, der bei der *in vitro* MRT-Untersuchung von Fibrinimplantaten, die im gleichen Verfahren wie in dieser Studie hergestellt wurden, ebenfalls eine randständige Hypointensität aufzeigte. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine homogene Zellverteilung im Präparat vor Implantation mit der Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Eine mögliche Erklärung sahen Berninger et al. (2019, S. 8) in einer Zellmigration während der Ausfällung des Implantats. Eine weitere Erklärung lieferten Lo et al. (2000, S. 147), die nachwiesen, dass Zellen sich in einem inhomogenen Substrat zur härteren Struktur hin orientieren. Da die verwendeten Implantate von außen beginnend aushärten, sind sie dort zunächst fester. Darüber hinaus haben auch die MSC im Implantat einen Einfluss auf dessen Steifigkeit und damit die Zellmigration (Duong et al., 2009, S. 1875).

Die vorliegende Arbeit untersuchte zudem, über welchen Zeitraum eine Nachverfolgung der implantierten Resovist®-markierten Zellen möglich ist. Es konnte abhängig von der gewählten Sequenz ein signifikanter Unterschied im Signal-zu-Rausch-Verhalten bzw. der T2/T2\*-Zeit am Ort der Implantation bis zur Abschlussuntersuchung nach 24 Wochen nachgewiesen werden. In der Literatur sind nur wenige Studien über MRT-Monitoring von SPIO-markierten Zellen über einen längeren Zeitraum (>12 Wochen) publiziert. Burk et al. (2016, S. 2205) konnten ebenfalls nach 24 Wochen SPIO-markierte MSC am Ort der Injektion, die in die oberflächliche Beugesehne im Pferdmodell erfolgte, in der T2\*-Sequenz nachweisen. In einem „Case-Report“ berichten Janowski et al. (2014, Abs. 3.1) über den MR-grafischen Nachweis SPIO-markierter Nabelschnurstammzellen bis zu 4



Monate nach Injektion in das Vorderhorn des lateralen Ventrikels bei einem 18 Monate alten Patienten. Die Arbeitsgruppe untersuchte die zelluläre MRT als Methode zum *Monitoring* von neurochirurgischen Stammzelltherapien und zur Beobachtung des ventrikulären cerebrospinalen System als Applikationsort für die Stammzellen. Die folgende Untersuchung war erst nach 33 Monaten *post injectionem* und konnte keine hypointensen Areale mehr nachweisen.

Limitierend ist, dass das *in vivo* Monitoring mittels MRT zunächst nur, abhängig von gewähltem Kontrastmittel und Sequenz, eine Hypo- oder Hyperintensität des untersuchten Gewebes zeigt. Ein direkter Rückschluss auf die Zellviabilität ist nicht möglich (Ma et al., 2015, S. 1). Henning et al. (2009b, S. 329) konnten *in vitro* eine unterschiedliche Veränderung der SNR bei der Untersuchung von Resovist®-markierten MSC abhängig von der Viabilität nachweisen. Hieraus folgerten sie, dass eine Differenzierung, ob sich das SPIO intra- oder extrazellulär befindet, *in vivo* möglich sein könnte. In der vorliegenden Arbeit konnten aus den Messdaten keine direkten Rückschlüsse hierzu gezogen werden. Durch vermehrte Externalisierung der SPIO müsste der T1 Effekt, also eine Minderung der SNR, zunehmen. Die Resovist®-markierten Implantate ergaben mit zunehmender *in vivo* Zeit jedoch ein zunehmendes Signal-zu-Rausch Verhältnis. In der Studie von Ma et. al (2015, S. 5) konnte im MRT ein hypointenses Areal am Ort der Injektion SPIO-markierter MSC im Myokard nachgewiesen werden. In der histologischen und molekularbiologischen Untersuchung stellte sich der größte Teil der implantierten Zellen avital dar und die SPIO-Partikel konnten intrazellulär in phagozytierenden Zellen nachgewiesen werden.

Die in allen Sequenzen beobachtete Veränderung der SNR bzw. der T2- und T2\*-Zeit könnte verschiedene Ursachen haben. Henning et al. (2012, S. 207) wiesen eine Abnahme der Signalintensität Resovist®-markierter MSC mit zunehmender *in vivo* Zeit im Rattenmodell nach. Sie zeigten, dass die Abnahme mit der Zellproliferation korrelierte. Auch die Migration der Zellen innerhalb des Implantats könnte eine Rolle spielen. So könnte auch eine weitere Migration der Zellen in die Umgebung der Empfängerstelle mit zunehmender *in vivo* Zeit für die abnehmende Unterscheidungsmöglichkeit zu unmarkierten Kontrollen führen. Dies konnten Jing et al. (2008, S. 435) zeigen, die SPIO-markierte mesenchymale Stammzellen nach 4 Wochen in einem artifiziell generierten Defekt im MRT nachweisen konnten. Nach 12 Wochen gelang dieser Nachweis jedoch nur noch in der Synovia und der Bursa suprapatellaris. In der vorliegenden Arbeit konnten in

den MRT-Bildern keine auffälligen hypointensen Signale in der Gelenkflüssigkeit oder dem Hoffa-Fettkörper dargestellt werden. Im Gegensatz zu dieser Studie wurden bei Jing et al. die Stammzellen aber auch intraartikulär injiziert und nicht in einen Defekt implantiert. Eine ergänzende Untersuchung der Synovialis und/oder der Synovialflüssigkeit scheint ein vielversprechender Ansatz für kommende Studien zu sein, da auch weitere Studien die Ergebnisse von Jing et al. untermauern (Delling et al., 2015, S. 2386).

Daher ist zur Beurteilung und Weiterentwicklung der zellulären MRT und das damit verbundene Monitoring der Vergleich mit den histologischen Untersuchungen obligat.

Eine andere Untersuchungsmethode des Knorpels, die auf MR-Kontrastmittel basiert, ist die *delayed gadolinium-enhanced MRI of cartilage* (dGEMRIC). Hierzu wird im Unterschied zur direkten Zellmarkierung das Kontrastmittel intravenös verabreicht. Dadurch ist nur eine Beurteilung der Oberfläche des Regeneratgewebes, nicht jedoch das Verhalten der implantierten Zellen möglich. In der Beurteilung des Knorpelgewebes ist dGEMRIC eher komplementär zum T2-/T2\*-Mapping zu sehen als eine Alternative, da es den Gehalt an Glukosaminoglykanen widerspiegelt, und T2-/T2\* eher sensitiv für Veränderung der Kollagen Matrix ist (Bittersohl et al., 2013, S. 1368). Zudem muss bei dGEMRIC die MRT-Aufnahme ca. 90min nach der intravenösen Gabe des Gadoliniums erfolgen, was im Untersuchungsablauf berücksichtigt werden muss (J. C. Goebel et al., 2010, S. 192). Endo et al. (2015, S. 285-6) verglichen T2-Mapping und dGEMRIC zur Evaluation von Knorpelheilung nach Chondrozytenimplantation im Kaninchenmodell und kamen auf vergleichbare Ergebnisse, wobei dGEMRIC in der frühen Phase der Defektheilung leicht effektiver war. Eine Markierung der Zellen wie in der vorliegenden Arbeit war bei Endo et al. jedoch nicht erfolgt.

In dieser Arbeit wurde daher aus den oben genannten Gründen auf dGEMRIC-Aufnahmen verzichtet, in weiteren Studien wäre ein Vergleich der verschiedenen Methoden jedoch ein interessanter Ansatz.

#### **4.4. Bildmorphologische Beurteilung des Regeneratgewebes**

Anhand der generierten Protonendichte gewichteten SPIR Sequenzen wurde das Regeneratgewebe für die 24 Wochen Gruppe bei der Untersuchung nach 12 Wochen und nach 24 Wochen beurteilt. Eine signifikante Verbesserung zwischen den beiden Untersuchungszeitpunkten konnte für das Gesamtergebnis, als auch für die Unterkategorien „Grad der Defektfüllung“, „Integration des Ersatzgewebes“, „Oberfläche“, „Struktur“ und „Signalintensität“ belegt werden. Von den zwei Unterpunkten, in denen keine Verbesserung auftrat, wurde der Unterpunkt „Erguss“ bereits besprochen. In der Kategorie „Subchondraler Knochen“ blieben Median und IQR gleich. Signifikante Unterschiede zwischen Resovist®-markierten und unmarkierten Implantaten wurden zu beiden Untersuchungszeitpunkten weder für das Gesamtergebnis noch für eine Unterkategorie sichtbar. Somit kann man daraus schließen, dass die Markierung der implantierten mesenchymalen Stammzellen mit Resovist® bildmorphologisch keinen Einfluss auf die Qualität des gebildeten Regenerationsgewebes zu haben scheint. Ein fehlender Differenzierungs-hemmender Effekt einer Markierung mit Resovist® wurde auch in *in vitro* Vorversuchen und im Mausmodell beschrieben (Henning et al., 2012, S. 198-208; Henning et al., 2009a, S. 172; Yang et al., 2011, S. 449-50).

Das Ergebnis von 67,5 von 80 Punkten auf der modifizierten MOCART-Skala im Median nach 24 Wochen ist als sehr gut einzuschätzen und mit anderen Ergebnissen vergleichbar. Die Verwendung, der für den klinischen Kontext entwickelten MOCART-Skala (zum Teil in angepasster Form) im Tiermodell ist etabliert und vielfach publiziert (Atta et al., 2017, S. 230; L. Goebel et al., 2014, S. 1387; Murata et al., 2020, S. 83). Bei der Implantation von *adipose tissue derived stem cells* in osteochondrale Defekte (vergleichbar mit den in dieser Studie erzeugten Defekten) erreichten die operierten Kaninchen in der verwendeten 2D MOCART Skala nach 12 Wochen ca. 60/100 Punkten (Murata et al., 2020, S. 86). Atta et al. (2017, S. 158) berichten 80/100 Punkten in der MOCART-Skala nach Therapie eines osteochondralen Defekts mit MSC aus der Nabelschnur im Kaninchenmodell.

## 4.5. Ausblick

Die Magnetresonanztomografie in Kombination mit einer Resovist®-Markierung der implantierten mesenchymalen Stammzellen zur Therapie osteochondraler Defekte konnte mit dieser Arbeit aufgrund des Nachweises einer Veränderung des SNR bzw. der T2/T2\*-Zeit bis zu 24 Wochen *post implantationem* als gute Untersuchungsmethode zum longitudinalen Monitoring bestätigt werden. Die Verwendung von Resovist® als Kontrastmittel scheint auch in Anbetracht der umfassenden Vorversuche (Berninger et al., 2019, S. 305-11; Berninger et al., 2013a, S. 1-6, 2013b, S. 1-8; Henning et al., 2012, S. 197-209; Henning et al., 2009a, S. 165-73; Sauerschnig et al., 2019, S. 1545-61) gut geeignet zu sein. Da noch viele Vorgänge in der Therapie mit mesenchymalen Stammzellen unklar sind und die Therapien in der klinischen Anwendung nicht immer den erwarteten Effekt haben (Goodfellow et al., 2016, S. 3899), ist eine weitere Verbesserung der Technik der zellulären MRT eminent wichtig. Einige wichtige Punkte sind hierbei die Verbesserung der MRT-Sequenzen mit kürzeren TE-Zeiten, höhere Feldstärken in MRT-Scannern und eine daraus resultierendes besseres Signal-zu-Rausch Verhältnis. Zudem ist das verwendete Kontrastmittel Resovist® aus kommerziellen Gründen in Europa und Amerika vom Markt genommen worden, weshalb andere Kontrastmittel getestet werden müssen. Auch eine Überprüfung der Methodik an größeren Tieren, deren Knorpelgewebe und Knorpeldicke dem Menschen ähnlicher ist, kann ein Schritt sein, um die zelluläre MRT als Monitoring des *Tissue Engineering* mit MSC *in vivo* zu etablieren und den Nutzen und die Anwendungssicherheit der Therapie in der klinischen Praxis zu verbessern.

## 5. Zusammenfassung

Hintergrund: Knorpelschäden und deren Folgen spielen eine zunehmende Rolle in den westlichen Industrienationen. Die Therapiemöglichkeiten durch die Verwendung von mesenchymalen Stammzellen im Rahmen des *Tissue Engineerings* zeigen vielversprechende Ansätze. Ob und in welcher Weise die implantierten Zellen direkt an der Bildung des neuen Gewebes beteiligt sind, ist noch Teil der aktuellen Forschung. Eine *in vivo* Darstellung dieser Prozesse könnte Aufschlüsse darüber geben und zukünftige Therapien optimieren. In dieser Arbeit wurde die zelluläre MRT als Möglichkeit des *in vivo* Monitorings der implantierten MSC besonders im Hinblick auf Beobachtung über 24 Wochen hin untersucht. Darüber hinaus wurde das gebildete Regeneratgewebe bildmorphologisch beurteilt.

Methoden: Allogene mesenchymale Stammzellen wurden in osteochondrale Defekte der Trochlea femoris von 36 *New Zealand White Rabbits* implantiert. Die eine Hälfte der Implantate enthielt MSC, die mit dem SPIO-Eisenkontrastmittel-Resovist® markiert wurden. Die andere Hälfte enthielt MSC, die nicht mit Resovist® markiert wurden und diente als Kontrolle. Es erfolgten MRT Untersuchungen nach 1, 4, 12 und 24 Wochen.

Ergebnisse: Ein signifikanter Unterschied des Signal-zu-Rausch Verhältnis bzw. der T2- und T2\*-Zeit konnte für die Untersuchung nach einer und nach vier Wochen für die PD-SPIR, die T2- und die T2\*-Sequenz gezeigt werden. In der T2\*-GRE Sequenz bestand der signifikante Unterschied sogar bis zur 24. Woche. Die Bewertung des Regeneratgewebes zeigte nach 24 Wochen gute bis sehr gute Ergebnisse. Die Markierung mit Resovist® hatte keinen Einfluss auf die postoperative Reaktion des Kniegelenks.

Schlussfolgerung: Ein *in vivo* Monitoring markierter MSC ist sequenzabhängig bis zu 24 Wochen möglich. Geeignet sind in der Frühphase besonders Protonendichte gewichtete SPIR- Sequenzen, da sie auch eine gute anatomische Beurteilung zulassen. Aufgrund der Sensitivität, scheint die T2\*-GRE Sequenz bei zunehmender *in vivo* Zeit überlegen zu sein. Die Verwendung des bereits ausgiebig *in vitro* getesteten Resovist® erscheint unbedenklich, da sich sowohl in der Beurteilung des Regeneratgewebes als auch bei der Ausbildung eines Knochenmarködems und Kniegelenkergusses kein Unterschied zwischen den Tieren mit markierten und denjenigen mit unmarkierten Implantaten nachweisen ließ.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abbas, M., Alkaff, M., Jilani, A., Alsehli, H., Damiati, L., Kotb, M., Abdelwahed, M., Alghamdi, F., & Kalamegam, G. (2018). Combination of mesenchymal stem cells, cartilage pellet and bioscaffold supported cartilage regeneration of a full thickness articular surface defect in rabbits. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 15(5), 661-71. doi:10.1007/s13770-018-0131-0
- Afizah, H., Yang, Z., Hui, J. H., Ouyang, H. W., & Lee, E. H. (2007). A comparison between the chondrogenic potential of human bone marrow stem cells (bmscs) and adipose-derived stem cells (adscs) taken from the same donors. *Tissue Engineering*, 13(4), 659-66. doi:10.1089/ten.2006.0118
- Alford, J. W., & Cole, B. J. (2005). Cartilage restoration, part 2: Techniques, outcomes, and future directions. *The American Journal of Sports Medicine*, 33(3), 443-60. doi:10.1177/0363546505274578
- Amiel, D., Toyoguchi, T., Kobayashi, K., Bowden, K., Amiel, M. E., & Healey, R. M. (2003). Long-term effect of sodium hyaluronate (hyalgan®) on osteoarthritis progression in a rabbit model. *Osteoarthritis and Cartilage*, 11(9), 636-43. doi:10.1016/s1063-4584(03)00119-5
- Amsalem, Y., Mardor, Y., Feinberg, M. S., Landa, N., Miller, L., Daniels, D., Ocherashvilli, A., Holbova, R., Yosef, O., Barbash, I. M., & Leor, J. (2007). Iron-oxide labeling and outcome of transplanted mesenchymal stem cells in the infarcted myocardium. *Circulation*, 116(11 Suppl), I38-45. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.680231
- Andriolo, L., Reale, D., Di Martino, A., De Filippis, R., Sessa, A., Zaffagnini, S., & Filardo, G. (2020). Long-term results of arthroscopic matrix-assisted autologous chondrocyte transplantation: A prospective follow-up at 15 years. *The American Journal of Sports Medicine*, 48(12), 2994-3001. doi:10.1177/0363546520949849
- Arbab, A. S., Wilson, L. B., Ashari, P., Jordan, E. K., Lewis, B. K., & Frank, J. A. (2005). A model of lysosomal metabolism of dextran coated superparamagnetic iron oxide (spio) nanoparticles: Implications for cellular magnetic resonance imaging. *NMR Biomed*, 18(6), 383-9. doi:10.1002/nbm.970
- Atta, H., Abbas, M., Alkaf, M., Kotb, M., Damiati, L., Karrouf, G., & Mahfouz, S. (2017). Human mesenchymal stem cells impregnated with autologous cartilage paste repair fresh focal osteochondral defects in rabbits. *International Journal of Medical Research Professionals*, 3(4), 155-8. doi:10.21276/ijmrp.2017.3.4.037
- Augello, A., & De Bari, C. (2010). The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells. *Human Gene Therapy*, 21(10), 1226-38. doi:10.1089/hum.2010.173
- Aulin, C., Jensen-Waern, M., Ekman, S., Hagglund, M., Engstrand, T., Hilborn, J., & Hedenqvist, P. (2013). Cartilage repair of experimentally induced osteochondral defects in new zealand white rabbits. *Laboratory Animals*, 47(1), 58-65. doi:10.1177/0023677212473716

- Bashir, A., Gray, M., Boutin, R., & Burstein, D. (1997). Glycosaminoglycan in articular cartilage: In vivo assessment with delayed gadopentetate-enhanced mr imaging. *Radiology*, 205(2), 551-8. doi:10.1148/radiology.205.2.9356644
- Bender, R., Lange, S., & Ziegler, A. (2007). Multiples testen. *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 132(S 01), e26-e9. doi:10.1055/s-2007-959035
- Benz, K., & Mollenhauer, J. (2007). Gelenkknorpel, arthrose und zelluläre reparatur. *Trauma und Berufskrankheit*, 9(4), 235-41. doi:10.1007/s10039-007-1270-z
- Berninger, M. T., Rodriguez-Gonzalez, P., Schilling, F., Haller, B., Lichtenstein, T., Imhoff, A. B., Rummeny, E. J., Anton, M., Vogt, S., & Henning, T. D. (2019). Bifunctional labeling of rabbit mesenchymal stem cells for mr imaging and fluorescence microscopy. *Molecular Imaging and Biology*, 22(2), 303-12. doi:10.1007/s11307-019-01385-8
- Berninger, M. T., Wexel, G., Rummeny, E. J., Imhoff, A. B., Anton, M., Henning, T. D., & Vogt, S. (2013a). Matrix-assisted autologous chondrocyte transplantation for remodeling and repair of chondral defects in a rabbit model. *Journal of Visualized Experiments*(75), e4422. doi:10.3791/4422
- Berninger, M. T., Wexel, G., Rummeny, E. J., Imhoff, A. B., Anton, M., Henning, T. D., & Vogt, S. (2013b). Treatment of osteochondral defects in the rabbit's knee joint by implantation of allogeneic mesenchymal stem cells in fibrin clots. *Journal of Visualized Experiments*(75), e4423. doi:10.3791/4423
- Betzer, O., Schwartz, A., Motiei, M., Kazimirsky, G., Gispan, I., Damti, E., Brodie, C., Yadid, G., & Popovtzer, R. (2014). Nanoparticle-based ct imaging technique for longitudinal and quantitative stem cell tracking within the brain: Application in neuropsychiatric disorders. *ACS Nano*, 8, 9274-85. doi:10.1021/nn503131h
- Bindslev, L., Haack-Sorensen, M., Bisgaard, K., Kragh, L., Mortensen, S., Hesse, B., Kjaer, A., & Kastrup, J. (2006). Labelling of human mesenchymal stem cells with indium-111 for spect imaging: Effect on cell proliferation and differentiation. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 33(10), 1171-7. doi:10.1007/s00259-006-0093-7
- Bittersohl, B., Hosalkar, H. S., Hughes, T., Kim, Y. J., Werlen, S., Siebenrock, K. A., & Mamisch, T. C. (2009). Feasibility of t2\* mapping for the evaluation of hip joint cartilage at 1.5t using a three-dimensional (3d), gradient-echo (gre) sequence: A prospective study. *Magnetic Resonance in Medicine*, 62(4), 896-901. doi:10.1002/mrm.22096
- Bittersohl, B., Miese, F. R., Dekkers, C., Senyurt, H., Kircher, J., Wittsack, H. J., Antoch, G., Krauspe, R., & Zilkens, C. (2013). T2\* mapping and delayed gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging in cartilage (dgemric) of glenohumeral cartilage in asymptomatic volunteers at 3 t. *European Radiology*, 23(5), 1367-74. doi:10.1007/s00330-012-2718-5
- Boddington, S., Henning, T. D., Sutton, E. J., & Daldrup-Link, H. E. (2008). Labeling stem cells with fluorescent dyes for non-invasive detection with optical imaging. *Journal of Visualized Experiments*(14), 1-2. doi:10.3791/686

- Bornes, T., Adesida, A. B., & Jomha, N. (2014). Mesenchymal stem cells in the treatment of traumatic articular cartilage defects: A comprehensive review. *Arthritis Research & Therapy*, *16*(432), 1-19. doi:10.1186/s13075-014-0432-1
- Boutry, S., Brunin, S., Mahieu, I., Laurent, S., Vander Elst, L., & Muller, R. N. (2008). Magnetic labeling of non-phagocytic adherent cells with iron oxide nanoparticles: A comprehensive study. *Contrast Media Mol Imaging*, *3*(6), 223-32. doi:10.1002/cmmi.256
- Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O., & Peterson, L. (1994). Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *The New England Journal of Medicine*, *331*(14), 889-95. doi:10.1056/NEJM199410063311401
- Buckwalter, J. A., Mankin, H. J., & Grodzinsky, A. J. (2005). Articular cartilage and osteoarthritis. *AAOS instructional Course Lectures*, *54*, 465-80.
- Bulte, J. W., & Kraitchman, D. L. (2004). Iron oxide mr contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR Biomed*, *17*(7), 484-99. doi:10.1002/nbm.924
- Burk, J., Berner, D., Brehm, W., Hillmann, A., Horstmeier, C., Josten, C., Paebst, F., Rossi, G., Schubert, S., & Ahrberg, A. B. (2016). Long-term cell tracking following local injection of mesenchymal stromal cells in the equine model of induced tendon disease. *Cell Transplant*, *25*(12), 2199-211. doi:10.3727/096368916X692104
- Chu, C., Szczodry, M., & Bruno, S. (2010). Animal models for cartilage regeneration and repair. *Tissue Engineering*, *16*(1), 105-15. doi:https://doi.org/10.1089/ten.teb.2009.0452
- Daldrup-Link, H. E. (2017). Ten things you might not know about iron oxide nanoparticles. *Radiology*, *284*(3), 616-29. doi:10.1148/radiol.2017162759
- Daldrup-Link, H. E., & Nejadnik, H. (2014). Mr imaging of stem cell transplants in arthritic joints. *J Stem Cell Res Ther*, *4*(2), 165. doi:10.4172/2157-7633.1000165
- David-Vaudey, E., Ghosh, S., Ries, M., & Majumdar, S. (2004). T2 relaxation time measurements in osteoarthritis. *Magnetic Resonance Imaging*, *22*(5), 673-82. doi:10.1016/j.mri.2004.01.071
- De Windt, T. S., Welsch, G. H., Brittberg, M., Vonk, L. A., Marlovits, S., Trattnig, S., & Saris, D. B. (2013). Is magnetic resonance imaging reliable in predicting clinical outcome after articular cartilage repair of the knee? A systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Sports Medicine*, *41*(7), 1695-702. doi:10.1177/0363546512473258
- Delling, U., Brehm, W., Metzger, M., Ludewig, E., Winter, K., & Julke, H. (2015). In vivo tracking and fate of intra-articularly injected superparamagnetic iron oxide particle-labeled multipotent stromal cells in an ovine model of osteoarthritis. *Cell Transplant*, *24*(11), 2379-90. doi:10.3727/096368914X685654



- Duong, H., Wu, B., & Tawil, B. (2009). Modulation of 3d fibrin matrix stiffness by intrinsic fibrinogen-thrombin compositions and by cellular activity. *Tissue Engineering: Part A*, 15(7), 1865-76. doi: 10.1089/ten.tea.2008.0319
- Elhami, E., Goertzen, A. L., Xiang, B., Deng, J., Stillwell, C., Mzengeza, S., Arora, R. C., Freed, D., & Tian, G. (2011). Viability and proliferation potential of adipose-derived stem cells following labeling with a positron-emitting radiotracer. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 38(7), 1323-34. doi:10.1007/s00259-011-1753-9
- Endo, J., Watanabe, A., Sasho, T., Yamaguchi, S., Saito, M., Akagi, R., Muramatsu, Y., Mukoyama, S., Katsuragi, J., Akatsu, Y., Fukawa, T., Okubo, T., Osone, F., & Takahashi, K. (2015). Utility of t2 mapping and dgemric for evaluation of cartilage repair after allograft chondrocyte implantation in a rabbit model. *Osteoarthritis Cartilage*, 23(2), 280-8. doi:10.1016/j.joca.2014.10.012
- Erggelet, C., & Vavken, P. (2016). Microfracture for the treatment of cartilage defects in the knee joint - a golden standard? *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*, 7(3), 145-52. doi:10.1016/j.jcot.2016.06.015
- Fernandez-Madrid, F., Karvonen, R., Teitge, R., Miller, P., An, T., & Negendank, W. (1995). Synovial thickening detected by mr imaging in osteoarthritis of the knee confirmed by biopsy as synovitis. *Magnetic Resonance Imaging*, 13(2), 177-83.
- Firbank, M. J., Coulthard, A., Harrison, R. M., & Williams, E. D. (1999). A comparison of two methods for measuring signal to noise ratio on mr images. *Physics in Medicine & Biology*, 44, N261-N4. doi:10.1088/0031-9155/44/12/403
- Franz, T., Hasler, E. M., Hagg, R., Weiler, C., Jakob, R. P., & Mainil-Varlet, P. (2001). In situ compressive stiffness, biochemical composition, and structural integrity of articular cartilage of the human knee joint. *Osteoarthritis Cartilage*, 9(6), 582-92. doi:10.1053/joca.2001.0418
- Frisbie, D., Cross, M., & Mcilwraith, C. (2006). A comparative study of articular cartilage thickness in the stifle of animal species used in human pre-clinical studies compared to articular thickness in the human knee. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 3(19), 142-6. doi:10.1055/s-0038-1632990
- Frisbie, D., Oxford, J., Southwood, L., Trotter, G., Rodkey, W., Steadman, J., Goodnight, J., & C., M. (2003). Early events in cartilage repair after subchondral bone microfracture. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 407, 215-27. doi:10.1097/01.blo.0000030514.43495.f3
- Gille, J., Behrens, P., Schulz, A. P., Oheim, R., & Kienast, B. (2016). Matrix-associated autologous chondrocyte implantation: A clinical follow-up at 15 years. *Cartilage*, 7(4), 309-15. doi:10.1177/1947603516638901
- Glenn, R. E., Jr., Mccarty, E. C., Potter, H. G., Juliao, S. F., Gordon, J. D., & Spindler, K. P. (2006). Comparison of fresh osteochondral autografts and allografts: A canine model. *Am J Sports Med*, 34(7), 1084-93. doi:10.1177/0363546505284846

- Glyn-Jones, S., Palmer, A. J. R., Agricola, R., Price, A. J., Vincent, T. L., Weinans, H., & Carr, A. J. (2015). Osteoarthritis. *The Lancet*, *386*(9991), 376-87. doi:10.1016/s0140-6736(14)60802-3
- Gobbi, A., Chaurasia, S., Karnatzikos, G., & Nakamura, N. (2015). Matrix-induced autologous chondrocyte implantation versus multipotent stem cells for the treatment of large patellofemoral chondral lesions: A nonrandomized prospective trial. *Cartilage*, *6*(2), 82-97. doi:10.1177/1947603514563597
- Gobbi, A., & Whyte, G. P. (2019). Long-term clinical outcomes of one-stage cartilage repair in the knee with hyaluronic acid-based scaffold embedded with mesenchymal stem cells sourced from bone marrow aspirate concentrate. *The American Journal of Sports Medicine*, *47*(7), 1621-8. doi:10.1177/0363546519845362
- Goebel, J. C., Pinzano, A., Grenier, D., Perrier, A. L., Henrionnet, C., Galois, L., Gillet, P., & Beuf, O. (2010). New trends in mri of cartilage: Advances and limitations in small animal studies. *Bio-Medical Materials and Engineering*, *20*(3), 189-94. doi:10.3233/BME-2010-0631
- Goebel, L., Zurakowski, D., Muller, A., Pape, D., Cucchiari, M., & Madry, H. (2014). 2d and 3d mocart scoring systems assessed by 9.4 t high-field mri correlate with elementary and complex histological scoring systems in a translational model of osteochondral repair. *Osteoarthritis Cartilage*, *22*(10), 1386-95. doi:10.1016/j.joca.2014.05.027
- Golovko, D. M., Henning, T., Bauer, J. S., Settles, M., Frenzel, T., Mayerhofer, A., Rummeny, E. J., & Daldrup-Link, H. E. (2010). Accelerated stem cell labeling with ferucarbotran and protamine. *Eur Radiol*, *20*(3), 640-8. doi:10.1007/s00330-009-1585-1
- Goodfellow, F., Simchick, G. A., Mortensen, L. J., Stice, S. L., & Zhao, Q. (2016). Tracking and quantification of magnetically labeled stem cells using magnetic resonance imaging. *Advanced Functional Materials*, *26*(22), 3899-915. doi:10.1002/adfm.201504444
- Gupta, R., Goel, A., & Pruthi, M. (2010). Treatment options for osteochondral defects. *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*, *1*(1), 16-22. doi:10.1016/s0976-5662(11)60004-0
- Hambly, K., Bobic, V., Wondrasch, B., Van Assche, D., & Marlovits, S. (2006). Autologous chondrocyte implantation postoperative care and rehabilitation: Science and practice. *Am J Sports Med*, *34*(6), 1020-38. doi:10.1177/0363546505281918
- Hangody, L., Kish, G., Kárpáti, Z., Szerb, I., & Udvarhelyi, I. (1997). Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condylar articular defects. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, *5*, 262-7. doi:10.1007/s001670050061
- Henkelman, R. M. (1985). Measurement of signal intensities in the presence of noise in mr images. *Medical Physics*, *12*(2), 232-3. doi:10.1118/1.595711

- Henning, T. D., Gawande, R., Khurana, A., Tavri, S., Mandrussow, L., Golovko, D., Horvai, A., Sennino, B., Mcdonald, D., Meier, R., Wendland, M., Derugin, N., Link, T. M., & Daldrup-Link, H. E. (2012). Magnetic resonance imaging of ferumoxide-labeled mesenchymal stem cells in cartilage defects: In vitro and in vivo investigations. *Molecular Imaging, 11*(3), 197-209. doi:10.2310/7290.2011.00040
- Henning, T. D., Sutton, E. J., Kim, A., Golovko, D., Horvai, A., Ackerman, L., Sennino, B., Mcdonald, D., Lotz, J., & Daldrup-Link, H. E. (2009a). The influence of ferucarbotran on the chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Contrast Media & Molecular Imaging, 4*(4), 165-73. doi:10.1002/cmml.276
- Henning, T. D., Wendland, M. F., Golovko, D., Sutton, E. J., Sennino, B., Malek, F., Bauer, J. S., Mcdonald, D. M., & Daldrup-Link, H. (2009b). Relaxation effects of ferucarbotran-labeled mesenchymal stem cells at 1.5t and 3t: Discrimination of viable from lysed cells. *Magnetic Resonance in Medicine, 62*(2), 325-32. doi:10.1002/mrm.22011
- Hiligsmann, M., Cooper, C., Arden, N., Boers, M., Branco, J. C., Luisa Brandi, M., Bruyere, O., Guillemin, F., Hochberg, M. C., Hunter, D. J., Kanis, J. A., Kvien, T. K., Laslop, A., Pelletier, J. P., Pinto, D., Reiter-Niesert, S., Rizzoli, R., Rovati, L. C., Severens, J. L., Silverman, S., Tsouderos, Y., Tugwell, P., & Reginster, J. Y. (2013). Health economics in the field of osteoarthritis: An expert's consensus paper from the european society for clinical and economic aspects of osteoporosis and osteoarthritis (esceo). *Seminars in Arthritis and Rheumatism, 43*(3), 303-13. doi:10.1016/j.semarthrit.2013.07.003
- Hirschmuller, A., Baur, H., Braun, S., Kreuz, P. C., Sudkamp, N. P., & Niemeyer, P. (2011). Rehabilitation after autologous chondrocyte implantation for isolated cartilage defects of the knee. *Am J Sports Med, 39*(12), 2686-96. doi:10.1177/0363546511404204
- Hsieh, S. C., Wang, F. F., Lin, C. S., Chen, Y. J., Hung, S. C., & Wang, Y. J. (2006). The inhibition of osteogenesis with human bone marrow mesenchymal stem cells by cdse/zns quantum dot labels. *Biomaterials, 27*(8), 1656-64. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.09.004
- Hui, J. H., Li, L., Teo, Y. H., Ouyang, H. W., & Lee, E. H. (2005). Comperativ study of the ability of mesenchymal stem cells derived from the bone marrow, periosteum, and adipose tissue in treatment of partial growth arrest in rabbit. *Tissue Engineering, 11*(5/6), 904-12. doi: 10.1089/ten.2005.11.904
- Hunter, W. (1742). Of the structure and diseases of articulating cartilages. *Royal Society, 42*, 514-21.
- Hunziker, E. B. (2002). Articular cartilage repair: Basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis and Cartilage, 10*(6), 432-63. doi:10.1053/joca.2002.0801
- Ittrich, H., Lange, C., Dahnke, H., Zander, A. R., Adam, G., & Nolte-Ernsting, C. (2005). [labeling of mesenchymal stem cells with different superparamagnetic particles of iron oxide and detectability with mri at 3t]. *Fortschritte auf dem Gebiet der*

*Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren*, 177(8), 1151-63.  
doi:10.1055/s-2005-858330

- Janowski, M., Walczak, P., Kroiwnicki, T., Jurkiewicz, E., Domanska-Janik, K., Bulte, J. W., Lukomska, B., & Roszkowski, M. (2014). Long-term mri cell tracking after intraventricular delivery in a patient with global cerebral ischemia and prospects for magnetic navigation of stem cells within the csf. *PLoS One*, 9(6), 1-7. doi:10.1371/journal.pone
- Jing, X. H., Yang, L., Duan, X. J., Xie, B., Chen, W., Li, Z., & Tan, H. B. (2008). In vivo mr imaging tracking of magnetic iron oxide nanoparticle labeled, engineered, autologous bone marrow mesenchymal stem cells following intra-articular injection. *Joint Bone Spine*, 75(4), 432-8. doi:10.1016/j.jbspin.2007.09.013
- Jo, C. H., Lee, Y. G., Shin, W. H., Kim, H., Chai, J. W., Jeong, E. C., Kim, J. E., Shim, H., Shin, J. S., Shin, I. S., Ra, J. C., Oh, S., & Yoon, K. S. (2014). Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: A proof-of-concept clinical trial. *Stem Cells*, 32(5), 1254-66. doi:10.1002/stem.1634
- Keinan-Adamsky, K., Shinar, H., & Navon, G. (2006). Multinuclear nmr and mri studies of the maturation of pig articular cartilage. *Magnetic Resonance Imaging*, 55(3), 532-40. doi:10.1002/mrm.20775
- Knutsen, G., Engebretsen, L., Ludvigsen, T. C., Drogset, J. O., Grontvedt, T., Solheim, E., Strand, T., Roberts, S., Isaksen, V., & Johansen, O. (2004). Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 86-A(3), 455-64. doi:10.2106/00004623-200403000-00001
- Kon, E., Muttini, A., Arcangeli, E., Delcogliano, M., Filardo, G., Nicoli Aldini, N., Pressato, D., Quarto, R., Zaffagnini, S., & Marcacci, M. (2010). Novel nanostructured scaffold for osteochondral regeneration: Pilot study in horses. *J Tissue Eng Regen Med*, 4(4), 300-8. doi:10.1002/term.243
- Kraff, O., & Quick, H. H. (2019). [safety of implants in high field and ultrahigh field mri]. *Radiologe*, 59(10), 898-905. doi:10.1007/s00117-019-0556-z
- Kreuz, P. C., Kalkreuth, R. H., Niemeyer, P., Uhl, M., & Erggelet, C. (2019). Long-term clinical and mri results of matrix-assisted autologous chondrocyte implantation for articular cartilage defects of the knee. *Cartilage*, 10(3), 305-13. doi:10.1177/1947603518756463
- Lai, R. C., Yeo, R. W. Y., Tan, S. S., Zhang, B., Yin, Y., Sze, N. S. K., Choo, A., & Lim, S. K. (2013). Mesenchymal stem cell exosomes: The future msc-based therapy? In *Mesenchymal stem cell therapy* (pp. 39-61).
- Li, L., Jiang, W., Luo, K., Song, H., Lan, F., Wu, Y., & Gu, Z. (2013). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as mri contrast agents for non-invasive stem cell labeling and tracking. *Theranostics*, 3(8), 595-615. doi:10.7150/thno.5366
- Liu, Z., Hu, X., Man, Z., Zhang, J., Jiang, Y., & Ao, Y. (2016). A novel rabbit model of early osteoarthritis exhibits gradual cartilage degeneration after medial collateral

- ligament transection outside the joint capsule. *Scientific Reports*, 6(1). doi:10.1038/srep34423
- Lo, C. M., Wang, H. B., Dembo, M., & Wang, Y. L. (2000). Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophysical Journal*, 79, 144-52. doi: 10.1016/S0006-3495(00)76279-5
- Lucidarme, O., Baleston, F., Cadi, M., Bellin, M. F., Charlotte, F., Ratziu, V., & Grenier, P. A. (2003). Non-invasive detection of liver fibrosis: Is superparamagnetic iron oxide particle-enhanced mr imaging a contributive technique? *European Radiology*, 13(3), 467-74. doi:10.1007/s00330-002-1667-9
- Ma, N., Cheng, H., Lu, M., Liu, Q., Chen, X., Yin, G., Zhu, H., Zhang, L., Meng, X., Tang, Y., & Zhao, S. (2015). Magnetic resonance imaging with superparamagnetic iron oxide fails to track the long-term fate of mesenchymal stem cells transplanted into heart. *Scientific Reports*, 5, 9058. doi:10.1038/srep09058
- Mamisch, T. C., Hughes, T., Mosher, T. J., Mueller, C., Trattnig, S., Boesch, C., & Welsch, G. H. (2012). T2 star relaxation times for assessment of articular cartilage at 3 t: A feasibility study. *Skeletal Radiology*, 41(3), 287-92. doi:10.1007/s00256-011-1171-x
- Mani, V., Briley-Saebo, K. C., Itskovich, V. V., Samber, D. D., & Fayad, Z. A. (2006). Gradient echo acquisition for superparamagnetic particles with positive contrast (grasp): Sequence characterization in membrane and glass superparamagnetic iron oxide phantoms at 1.5t and 3t. *Magn Reson Med*, 55(1), 126-35. doi:10.1002/mrm.20739
- Marmotti, A. G., Peretti, G. M., Mattia, S., Bonasia, D. E., Bruzzone, M., Dettoni, F., Rossi, R., & Castoldi, F. (2014). A future in our past: The umbilical cord for orthopaedic tissue engineering. *Joints*, 2(1), 20-5. doi:10.11138/jts/2014.2.1.020
- Mo, X. T., Guo, S. C., Xie, H. Q., Deng, L., Zhi, W., Xiang, Z., Li, X. Q., & Yang, Z. M. (2009). Variations in the ratios of co-cultured mesenchymal stem cells and chondrocytes regulate the expression of cartilaginous and osseous phenotype in alginate constructs. *Bone*, 45(1), 42-51. doi:10.1016/j.bone.2008.07.240
- Müller, M., Reimer, P., Wiedermann, D., Allkemper, T., Marx, C., Tombach, B., Rummeny, E. J., Shamsi, K., Balzer, T., & Peters, P. E. (1998). T1-gewichtete dynamische mrt mit neuen supramagnetischen eisenoxidpartikeln (resovist®): Ergebnisse einer studie am phantom sowie an 25 patienten. *Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und bildgebenden Verfahren*, 168(3), 228-36. doi:10.1055/s-2007-1015118
- Murata, D., Kunitomi, Y., Harada, K., Tokunaga, S., Takao, S., & Nakayama, K. (2020). Osteochondral regeneration using scaffold-free constructs of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells made by a bio three-dimensional printer with a needle-array in rabbits. *Regenerative Therapy*, 15, 77-89. doi:10.1016/j.reth.2020.05.004

- Nejadnik, H., Hui, J. H., Feng Choong, E. P., Tai, B. C., & Lee, E. H. (2010). Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus autologous chondrocyte implantation: An observational cohort study. *The American Journal of Sports Medicine*, 38(6), 1110-6. doi:10.1177/0363546509359067
- Nejadnik, H., Lenkov, O., Gassert, F., Fretwell, D., Lam, I., & Daldrup-Link, H. E. (2016). Macrophage phagocytosis alters the mri signal of ferumoxytol-labeled mesenchymal stromal cells in cartilage defects. *Sci Rep*, 6, 25897. doi:10.1038/srep25897
- Newman, A. P. (1998). Articular cartilage repair. *The American Journal of Sports Medicine*, 26(2), 309-24. doi:10.1177/03635465980260022701
- Nissi, M. J., Töyräs, J., Laasanen, M. S., Rieppo, J., Saarakkala, S., Lappalainen, R., Jurvelin, J. S., & Nieminen, M. T. (2004). Proteoglycan and collagen sensitive mri evaluation of normal and degenerated articular cartilage *Journal of Orthopaedic Research*, 22, 557-64. doi:10.1016/j.orthres.2003.09.008
- Østergaard, M., Hansen, M., Stoltenberg, M., Gideon, P., Klarlund, M., Jensen, E., & Lorenzen, I. (1999). Magnetic resonance imaging-determined synovial membrane volume as a marker of disease activity and a predictor of progressive joint destruction in the wrists of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 42(5), 918-29. doi:10.1002/1529-0131(199905)42:5<918::AID-ANR10>3.0.CO;2-2
- Pai, A., Li, X., & Majumdar, S. (2008). A comparative study at 3 t of sequence dependence of t2 quantitation in the knee. *Magnetic Resonance Imaging*, 26(9), 1215-20. doi:10.1016/j.mri.2008.02.017
- Papacrhistou, G., Anagnostou, S., & Katsorhis, T. (1997). The effect of intraarticular hydrocortisone injection on the articular cartilage of rabbits. *Acta Orthopaedica*, 275, 132-4. doi:10.1080/17453674.1997.11744766
- Parashurama, N., Ahn, B. C., Ziv, K., Ito, K., Paulmurugan, R., Willmann, J., Chung, J., Ikeno, F., Swanson, J., Merk, D., Lyons, J., D., Y., Teramoto, T., Kosuge, H., Dao, C., Ray, P., Patel, M., Chang, Y., Mahmoudi, M., Cohan, J., Goldstone, A., Habte, F., Bhaumik, S., Yaghoubi, S., Robbins, R., Dash, R., Yang, P., Brinton, T., Yock, P., McConnel, M., & Gambhir, S. (2016). Multimodality molecular imaging of cardiac cell transplantation: Part ii. In vivo imaging of bone marrow stromal cells in swine with pet/ct and mr imaging. *Radiology*, 280(3), 826-36. doi:10.1148/radiol.2016151150
- Pelletier, J. P., Raynauld, J. P., Berthiaume, M. J., Abram, F., Choquette, D., Haraoui, B., Beary, J. F., Cline, G. A., Meyer, J. M., & Martel-Pelletier, J. (2007). Risk factors associated with the loss of cartilage volume on weight-bearing areas in knee osteoarthritis patients assessed by quantitative magnetic resonance imaging: A longitudinal study. *Arthritis Res Ther*, 9(4), R74. doi:10.1186/ar2272
- Pool, A. R., Kojima, T., Yasuda, T., Mwale, F., Kobayashi, M., & Lavery, S. (2001). Composition and structure of articular cartilage: A template for tissue repair.

*Clinical Orthopaedics and Related Research*, 391S, 26-33. doi:10.1097/00003086-200110001-00004

- Prockop, D. J. (2009). Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (mscs): Controversies, myths, and changing paradigms. *Molecular Therapy*, 17(6), 939-46. doi:10.1038/mt.2009.62
- Reichenbach, J., Venkatesan, R., Yablonskiy, D., Thompson, M. L., S., & Haacke, E. M. (1997). Theory and application of static field inhomogeneity effects in gradient-echo imaging. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 7(2), 266-79. doi: 10.1002/jmri.1880070203
- Reimer, P., & Balzer, T. (2003). Ferucarbotran (resovist): A new clinically approved res-specific contrast agent for contrast-enhanced mri of the liver: Properties, clinical development, and applications. *European Radiology*, 13(6), 1266-76. doi:10.1007/s00330-002-1721-7
- Richter, W. (2005). Stammzellen in der knorpelforschung. *Aktuelle Traumatologie*, 35(5), 249-54. doi:10.1055/s-2005-865948
- Ridgway, J. P. (2010). Cardiovascular magnetic resonance physics for clinicians: Part i. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*, 12(71), 1-28. doi:https://doi.org/10.1186/1532-429X-12-71
- Robson, M. D., Gatehouse, P., Bydder, M., & Bydder, G. M. (2003). Magnetic resonance: An introduction to ultrashort te (ute) imaging. *Journal of computer assisted Tomography*, 27(6), 825-46. doi:10.1097/00004728-200311000-00001
- Ronga, M., Angeretti, G., Ferraro, S., De Falco, G., Genovese, E., & Cherubino, P. (2014). Imaging of articular cartilage: Current concepts. *Joints*, 2(3), 137-40. doi: 10.11138/jts/2014.2.3.137
- Rumenapp, C., Gleich, B., & Haase, A. (2012). Magnetic nanoparticles in magnetic resonance imaging and diagnostics. *Pharmaceutical Research*, 29(5), 1165-79. doi:10.1007/s11095-012-0711-y
- Sadineni, R. T., Pasumarthy, A., Bellapa, N. C., & Velicheti, S. (2015). Imaging patterns in mri in recent bone injuries following negative or inconclusive plain radiographs. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(10), TC10-3. doi:10.7860/JCDR/2015/15451.6685
- Sauerschnig, M., Berninger, M. T., Kaltenhauser, T., Plecko, M., Wexel, G., Schonfelder, M., Wienerroither, V., Imhoff, A. B., Schottle, P. B., Rosado Balmayor, E., & Salzmann, G. M. (2019). Chondrocyte culture parameters for matrix-assisted autologous chondrocyte implantation affect catabolism and inflammation in a rabbit model. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7). doi:10.3390/ijms20071545
- Saville, D. J. (2015). Multiple comparison procedures-cutting the gordian knot. *Agronomy Journal*, 107(2), 730-5. doi:10.2134/agronj2012.0394
- Saw, K. Y., Anz, A., Siew-Yoke Jee, C., Merican, S., Ching-Soong Ng, R., Roohi, S. A., & Ragavanaidu, K. (2013). Articular cartilage regeneration with autologous

- peripheral blood stem cells versus hyaluronic acid: A randomized controlled trial. *Arthroscopy*, 29(4), 684-94. doi:10.1016/j.arthro.2012.12.008
- Schick, F. (2005). [the bases of magnetic resonance tomography]. *Radiologe*, 45(1), 69-86; quiz 7-8. doi:10.1007/s00117-004-1146-1
- Schlumberger, M., Schuster, P., Bulow, H. J., Mayer, P., Eichinger, M., Immendorfer, M., & Richter, J. (2020). [technique of all arthroscopic autologous chondrocyte implantation (aci) for the treatment of cartilage defects in the knee]. *Operative Orthopädie und Traumatologie*. doi:10.1007/s00064-020-00657-9
- Schreiner, M. M., Raudner, M., Marlovits, S., Bohndorf, K., Weber, M., Zalaudek, M., Rohrich, S., Szomolanyi, P., Filardo, G., Windhager, R., & Trattng, S. (2019). The mocart (magnetic resonance observation of cartilage repair tissue) 2.0 knee score and atlas. *Cartilage*, 1947603519865308. doi:10.1177/1947603519865308
- Schulze-Tanzil, G. (2009). Activation and dedifferentiation of chondrocytes: Implications in cartilage injury and repair. *Annals of Anatomy*, 191(4), 325-38. doi:10.1016/j.aanat.2009.05.003
- Seppenwoolde, J. H., Viergever, M. A., & Bakker, C. J. (2003). Passive tracking exploiting local signal conservation: The white marker phenomenon. *Magnetic Resonance Imaging*, 50(4), 784-90. doi:10.1002/mrm.10574
- Sheperd, D., & Seedhorn, B. (1999). Thickness of human articular cartilage in joints of the lower limb. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 58, 27-34.
- Sonin, A. H., Pensy, R. A., Mulligan, M. E., & Hatem, S. (2001). Grading articular cartilage of the knee using fast spin-echo proton-density-weightedmr imaging without fat suppression. *American Journal of Roentgenology*, 179, 1159-2002. doi:10.2214/ajr.179.5.1791159
- Souza, R. B., Kumar, D., Calixto, N., Singh, J., Schooler, J., Subburaj, K., Li, X., Link, T. M., & Majumdar, S. (2014). Response of knee cartilage t1rho and t2 relaxation times to in vivo mechanical loading in individuals with and without knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 22(10), 1367-76. doi:10.1016/j.joca.2014.04.017
- Steinert, A. F., Ghivizzani, S. C., Rethwilm, A., Tuan, R. S., Evans, C. H., & Noth, U. (2007). Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage. *Arthritis Res Ther*, 9(3), 213. doi:10.1186/ar2195
- Stockwell, R. (1971). The interrelationship of cell density and cartilage thickness in mammalian articular cartilage. *Journal of Anatomy*, 109(3), 411-21.
- Strioga, M., Viswanathan, S., Darinskas, A., Slaby, O., & Michalek, J. (2012). Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells and Development*, 21(14), 2724-52. doi:10.1089/scd.2011.0722
- Tao, H., Li, H., Hua, Y., Chen, Z., Feng, X., & Chen, S. (2015). Quantitative magnetic resonance imaging (mri) evaluation of cartilage repair after microfracture treatment for full-thickness cartilage defect models in rabbit knee joints:



- Correlations with histological findings. *Skeletal Radiology*, 44(3), 393-402.  
doi:10.1007/s00256-014-2062-8
- Taupitz, M., Schmitz, S., & Hamm, B. (2003). [superparamagnetische eisenoxidpartikel: Aktueller stand und zukünftige entwicklungen]. *Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und bildgebenden Verfahren*, 175, 752-65. doi:10.1055/s-2003-39935
- Tsuchiya, K., Chen, G., Ushida, T., Matsuno, T., & Tateishi, T. (2004). The effect of coculture of chondrocytes with mesenchymal stem cells on their cartilaginous phenotype in vitro. *Materials Science and Engineering: C*, 24(3), 391-6. doi:10.1016/j.msec.2003.12.014
- Tyler, D. J., Robson, M. D., Henkelman, R. M., Young, I. R., & Bydder, G. M. (2007). Magnetic resonance imaging with ultrashort te (ute) pulse sequences: Technical considerations. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 25(2), 279-89. doi:10.1002/jmri.20851
- Verstraete, K. L., Almqvist, F., Verdonk, P., Vanderschueren, G., Huysse, W., Verdonk, R., & Verbrugge, G. (2004). Magnetic resonance imaging of cartilage and cartilage repair. *Clinical Radiology*, 59(8), 674-89. doi:10.1016/j.crad.2004.01.012
- Vogt, S., Braun, S., & Imhoff, A. B. (2007). [stage oriented surgical cartilage therapy. Current situation]. *Zeitschrift für Rheumatologie*, 66(6), 493-503; quiz 4. doi:10.1007/s00393-007-0213-1
- Watanabe, A., Boesch, C., Anderson, S. E., Brehm, W., & Mainil Varlet, P. (2009). Ability of dgemric and t2 mapping to evaluate cartilage repair after microfracture: A goat study. *Osteoarthritis and Cartilage*, 17(10), 1341-9. doi:10.1016/j.joca.2009.03.022
- Wei, X., Gao, J., & Messner, K. (1997). Maturation-dependent repair of untreated osteochondral defects in the rabbit knee joint. *Journal of Biomedical Materials Research*, 34, 63-72.
- Welch, T., Mandelbaum, B., & Tom, M. (2016). Autologous chondrocyte implantation: Past, present, and future. *Sports Medicine and Arthroscopy Review*, 24(2), 85-91. doi:10.1097/JSA.0000000000000115
- Xing, D., Wang, Q., Yang, Z., Hou, Y., Zhang, W., Chen, Y., & Lin, J. (2018). Mesenchymal stem cells injections for knee osteoarthritis: A systematic overview. *Rheumatology International*, 38(8), 1399-411. doi:10.1007/s00296-017-3906-z
- Yamashita, Y., Yamamoto, H., Hirai, A., Yoshimatsu, S., Baba, Y., & Takahashi, M. (1996). Mr imaging enhancement with superparamagnetic iron oxide in chronic liver disease: Influence of liver dysfunction and parenchymal pathology. *Abdominal Imaging*, 21, 318-23. doi:10.1007/s002619900072
- Yang, C. Y., Hsiao, J. K., Tai, M. F., Chen, S. T., Cheng, H. Y., Wang, J. L., & Liu, H. M. (2011). Direct labeling of hmsc with spio: The long-term influence on toxicity,

chondrogenic differentiation capacity, and intracellular distribution. *Molecular Imaging and Biology*, 13(3), 443-51. doi:10.1007/s11307-010-0360-7

Zee, C., Segall, H., Terk, M., Destian, S., Ahmadi, J., Gober, J., & Colletti, P. (1992). Spir mri in spinal diseases *Journal of computer assisted Tomography*, 16(3), 356-60. doi: 10.1097/00004728-199205000-00004

Zhang, S., Chuah, S., Lai, R. C., Hui, J. H., Lim, S. K., & Toh, W. S. (2018). Msc exosomes mediate cartilage repair by enhancing proliferation, attenuating apoptosis and modulating immune reactivity. *Biomaterials*, 156, 16-27. doi:10.1016/j

Zhao, Q., Langley, J., Lee, S., & Liu, W. (2011). Positive contrast technique for the detection and quantification of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in mri. *NMR Biomed*, 24(5), 464-72. doi:10.1002/nbm.1608

## 7. Anhang

### Beurteilungsskala Überwachung Versuchstiere

**Titel: "Kontrastmittelgestützte zelluläre Magnetresonanztomographie (MRT) zum  
Therapiemonitoring bei Knorpelersatztherapien am Kaninchenmodell",  
Az. 55.2.1.43-2532-105-11**

**Projektleiter: OA Dr. med. Stephan Vogt**

**Datum:**

**Untersucher:**

**Tiernummer:**

Allgemeinbefinden:	Wach/aufmerksam	0
	Ängstlich/nervös	1
	Reduziert	2
	Apathisch	3
Futteraufnahme:	Ja	0
	Verändert	1
	Nein	2
Wasseraufnahme:	Ja	0
	Verändert	1
	Nein	2
Kotabsatz:	Ja	0
	Verändert	1
	Nein	2
Harnabsatz:	Ja	0
	Verändert	1
	Nein	2
Haarkleid:	Gepflegt/sauber	0
	Fellpflege, aber teilweise unsauber	1
	Keine Fellpflege/unsauber	2
Schleimhaut:	Rosa	0
	Blassrosa	1
	Weiß	2
Ausfluss (Nase, Auge):	Nein	0
	Mittel	1
	Hochgradig	2
Atemgeräusch:	Nein	0
	Ja (leicht)	1
	Ja (mittel)	2
Atemtyp:	Normal	0
	Abnormal	1
Lahmheit	Nein	0
	Ja (leicht)	1
	Ja (mittel)	2
	Ja (schwer)	3

**0 Punkte** ohne besonderen Befund,

**1-10 Punkte** weiter beobachten, Ursachen abklären und beheben

**11-19 Punkte** weiter beobachten, Ursachen abklären und beheben, **je nach Diagnose Euthanasie**

**≥20 Punkte** **Euthanasie**

**Spezielle Abbruchkriterien: Gelenksinfektion, tiefe Nahtdehiszenz, Fraktur, Körpergewicht -15%**

## 8. Danksagung

Ohne Hilfe wäre die Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Stephan Vogt für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung im Rahmen des Doktorandenseminar.

Herrn Dr. med. Markus Berninger bin ich zu größtem Dank für die Unterstützung bei der Vorbereitung und Durchführungen der Operationen, der anschließenden Untersuchungen und vor allem der Ausarbeitung der schriftlichen Arbeit verpflichtet. Ohne seine große Hilfe über diesen langen Zeitraum, wäre die Fertigstellung nicht gelungen.

Ebenso möchte ich mich besonders bei PD Dr. med. Tobias Henning für die Unterstützung bei den MRT-Untersuchungen und deren Auswertungen bedanken.

Vielen Dank an Megan Fleming für die Zusammenarbeit während der Operationen und Nachsorge.

Für die tierärztliche Unterstützung geht mein Dank an Frau Dr. Gabriele Wexel und vor allem Herrn Peter Sommer, der bei mehr als hundert Stunden MRT-Zeit die optimale Versorgung der Versuchstiere gewährleistet hat. Ebenso danke ich den weiteren Mitarbeitern des Zentrums für präklinische Forschung am Klinikum rechts der Isar.

Zudem danke ich Dr. Marcus Settles für die Planung der MRT-Sequenzen und die Einarbeitung in das Ingenia® MRT.

An Dr. Bernhard Haller geht mein Dank für die Beratung und Überprüfung meiner statistischen Methoden.

Lisa und Fritz, vielen Dank für die ersten Korrekturen der schriftlichen Arbeit.

Nadine, diese Arbeit ist für Dich. Ohne Deine Unterstützung über all die Jahre, wären diese Seiten leer. Ob am Anfang mit Neugeborenen zu Hause und zuletzt mit Homeschooling während Corona hast du mir immer den Rücken freigehalten und mir ermöglicht, mir die Zeit für diese Arbeit und das Studium zu nehmen.

Zuletzt danke ich meinen Eltern, die mir trotz endloser Wartesemester das Studium ermöglicht haben.