

Bildbasierte Analyse der Ultrastruktur des humanen Kniegelenk-Knorpels mittels Synchrotron-Radiation- μ CT

K.R. Beutler^{1,6}, M. Danalache², B. Rolauffs³, I. Greving⁴, S. Fischer^{5,7}, J.M. Wolgart¹, F.C. Bonnaire², U.K. Hofmann²

¹Medizinische Fakultät der Universität Tübingen, 72076 Tübingen, Deutschland. ²Universitätsklinik für Orthopädie, Universitätsklinikum Tübingen, Hoppe-Seyler-Strasse 3, 72076 Tübingen, Deutschland. ³Institut für Werkstofforschung, Helmholtz-Zentrum Geesthacht, Geesthacht, Deutschland. ⁴Institut für Evolution und Ökologie, Lehrbereich Evolutionsbiologie der Invertebraten, Auf der Morgenstelle 28E, 72076 Tübingen, Deutschland. ⁵G.E.R.N. Tissue Replacement, Regeneration & Neogenesis, Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Freiburg, Medizinische Fakultät, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, 79108 Freiburg, Deutschland. ⁶Aktuelle Zugehörigkeit: Klinik für Orthopädie & Traumatologie, Spital Thurgau AG, Spitalcampus 1, 8596 Münsterlingen, Schweiz. ⁷Aktuelle Zugehörigkeit: Tübingen Structural Microscopy (TSM), Center for Applied Geoscience (ZAG), Universität Tübingen, 72076 Tübingen, Deutschland. ✉Kontakt: kevin.beutler@kbeutler.com

Fragestellung

Ein detailliertes Wissen über die Architektur des Gelenkknorpels ist essentiell zur Entwicklung und Weiterentwicklung von Therapieverfahren der manifesten Osteoarthritis (OA). Vorangehende Arbeiten konnten histologisch zeigen, dass sich Chondrozyten abhängig vom Degenerationsgrad zu charakteristischen räumlichen Mustern anordnen. Die Nutzung dieser Muster als bildbasierte Biomarker für OA wurde vorgeschlagen. Die bisher veröffentlichten Daten beziehen sich ausschliesslich auf Chondrozyten in der oberflächlichsten Probenregion und entsprechend wurden die Muster als „*superficial zone chondrocyte spatial organizations*“ (SCSOs) benannt.^[1,2] Das Ziel dieser Arbeit war es, mittels Synchrotron-Radiation-micro-CT (SR- μ CT) eine Technik zur hochauflösenden, dreidimensionalen Darstellung, Untersuchung und Kartographie des humanen Kniegelenk-Knorpels auf zellulärem Niveau über alle Knorpelschichten zu etablieren und somit sowohl die absolute Position der Zellmuster im Knorpel, als auch die dreidimensionale Ausdehnung der OA visualisieren zu können.

Methodik

Humane, arthrotisch veränderte Femurkondylenresektate wurden zu Zylindern (20 × 20 × 3 mm) präpariert, mit röntgenkontrastverstärkenden Antikörpern gefärbt und mittels SR- μ CT digitalisiert, segmentiert und qualitativ analysiert. Histologische Aufnahmen vor und nach der μ CT dienten der quantitativen sowie der vergleichenden qualitativen Analyse.

Resultate

Die vorbeschriebenen Zellmuster konnten sowohl zweidimensional histologisch, als auch dreidimensional radiologisch re-identifiziert werden. Die μ CT-Technik erlaubte die Beurteilung der gesamten Probe und somit die absolute Lokalisation der Zellmuster im Knorpel. In Zonen mit intakter Knorpeloberfläche wurde auch in tieferen Schichten eine physiologische zelluläre Anordnung vorgefunden. In Zonen mit Knorpeldefekten wurden die (S)CSOs schichtenübergreifend angetroffen, wobei ein räumlicher Zusammenhang der Defektzonen dargestellt werden konnte. Das Ausmass der zellulären Re-Organisation korrelierte mit dem makroskopischen Grad der Gewebeerstörung. In an die Defektzonen angrenzenden Knorpelregionen mit erhaltener Superficialzone konnten bereits leichtgradig veränderte Zellmuster in der Probentiefe identifiziert werden.

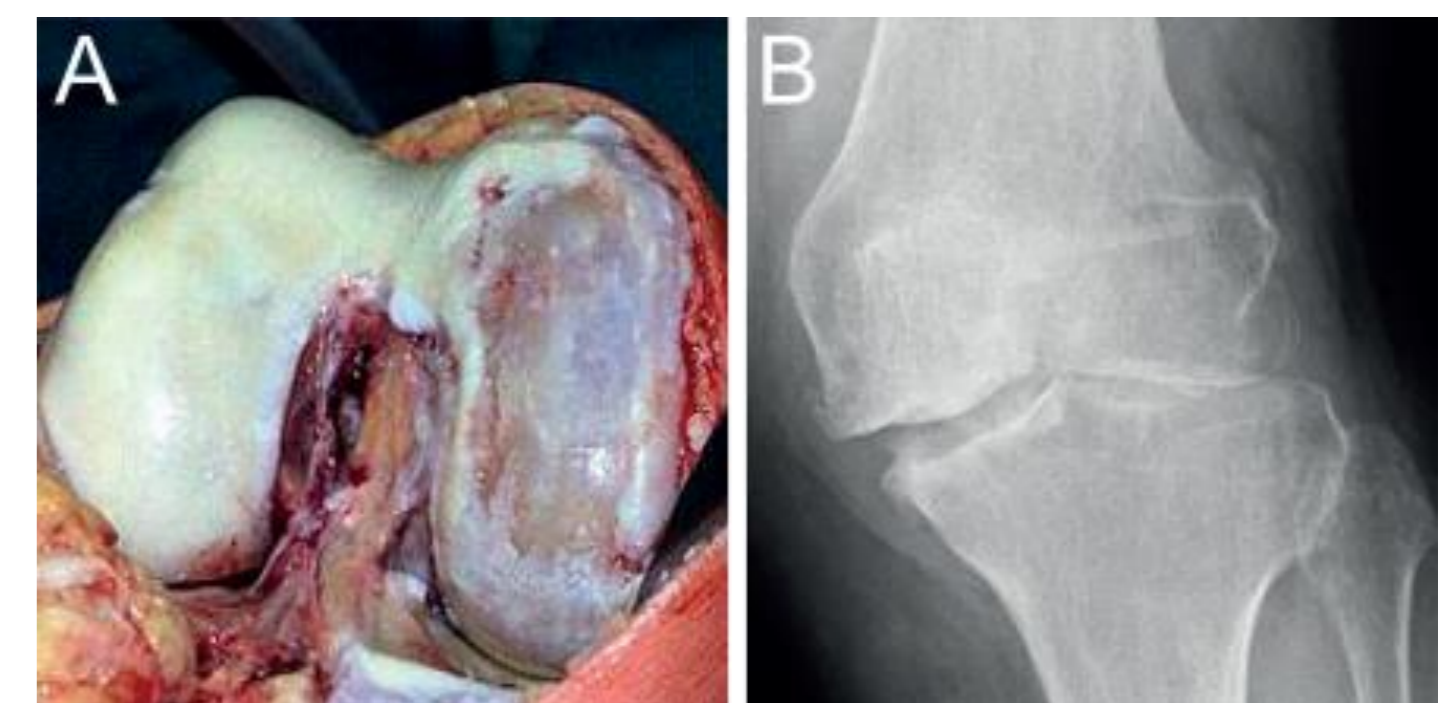


Abb. 1: Manifeste, endgradige Osteoarthritis des Kniegelenks
Intraoperativer Befund (A): Axiale Sicht auf das distale Femur. Der Gelenkknorpel ist unikonkylär endgradig abgenutzt („Knorpelglätze“). Radiologischer Befund (B): Koronare Sicht auf das Kniegelenk. Zu sehen sind unilaterale Gelenkspalterstörung, subchondrale Sklerosierung, osteophytäre Anbauten.

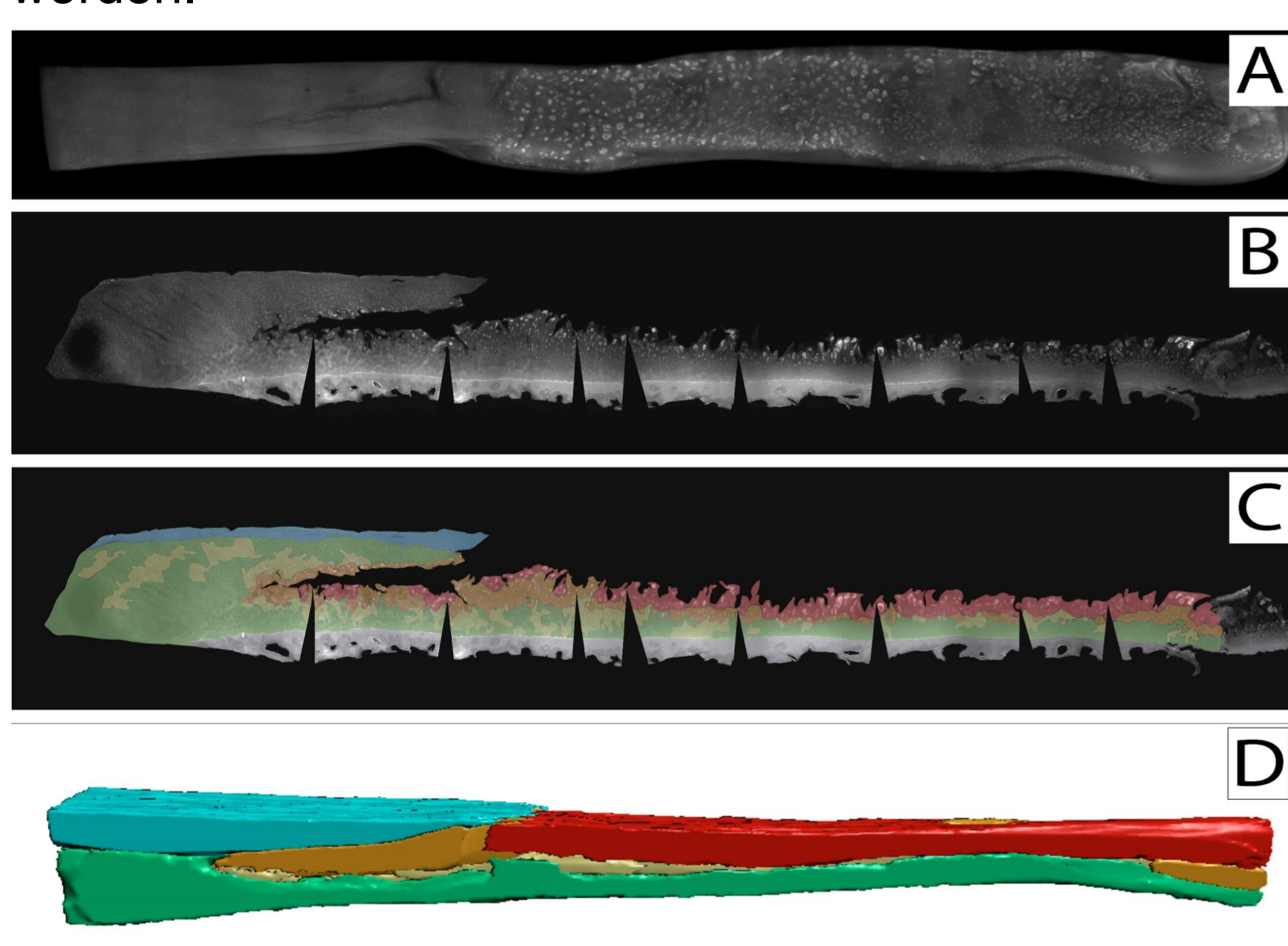


Abb. 2: Histologische Aufnahmen & 2D/3D-Kartographie der Probe #1^[5]
Fluoreszierende, histologische Aufnahmen (DAPI, Nuclei=weiss) aus der Top-Down-Ansicht (A) sowie der Seitensicht (B+C) und en-bloc-segmentierte μ CT-Aufnahme (D). In der zweiten Seitensicht (C) wurden die Zonen mit dem jeweils prädominanten CSO segmentiert und farblich codiert hervorgehoben. Aus Darstellungszwecken wurden die Probenkrümmungen durch vertikale Inzisionen begründet (B+C, schwarze Dreiecke). In der Top-Down-Ansicht (A) scharfer Übergang einer homogenen Zellverteilung, häufig in Einzelstringformation und ohne fokale Konzentrationen von Fluoreszenzsignalen im linken Probendrittel zu einer Ansammlung runder Zellgruppierungen mit verstärkter Fluoreszenz. Auffallend gross und hell leuchtend erscheinen die Gruppierungen im mittleren Probendrittel. In der Seitensicht (B) scharfer Übergang der Morphologie von reichlicher Probensubstanz mit homogenem apikalen Relief im linken Probendrittel zu einem ausgeprägten Substanzverlust mit deutlich aufgerautem apikalen Relief mit tiefgreifenden Fissuren. In der segmentierten Seitensicht (C) scharfer Übergang der räumlichen Zellorientierung und -konzentration. Im linken Drittel bildet die oberste Schicht ein Areal mit tangential zur Knorpeloberfläche verlaufenden, überwiegend zu Einzelstrings formierten Zellen in hoher Konzentration (blau). Basal davon sind die Zellen überwiegend als arkadenförmige Einzelstrings (grün) und teilweise Doppelstrings (gelb) formiert. In den rechten beiden Dritteln fehlen die Zellen im Bereich des Substanzdefekts vollständig. Zwischen den tiefen, zellfreien Fissuren sind räumliche, grosse Zellgruppierungen mit hoher Fluoreszenzsignalkonzentration zu erkennen (rot), unmittelbar basal davon präsentieren sich Regionen kleinerer Zellgruppierungen (orange). In der basalen Knorpelzone vor dem subchondralen Knochen sind Einzel- und Doppelstrings zu finden. In der segmentierten en-bloc-Aufnahme (D) ist die Korrelation der Defektzonen im dreidimensionalen Raum veranschaulicht.

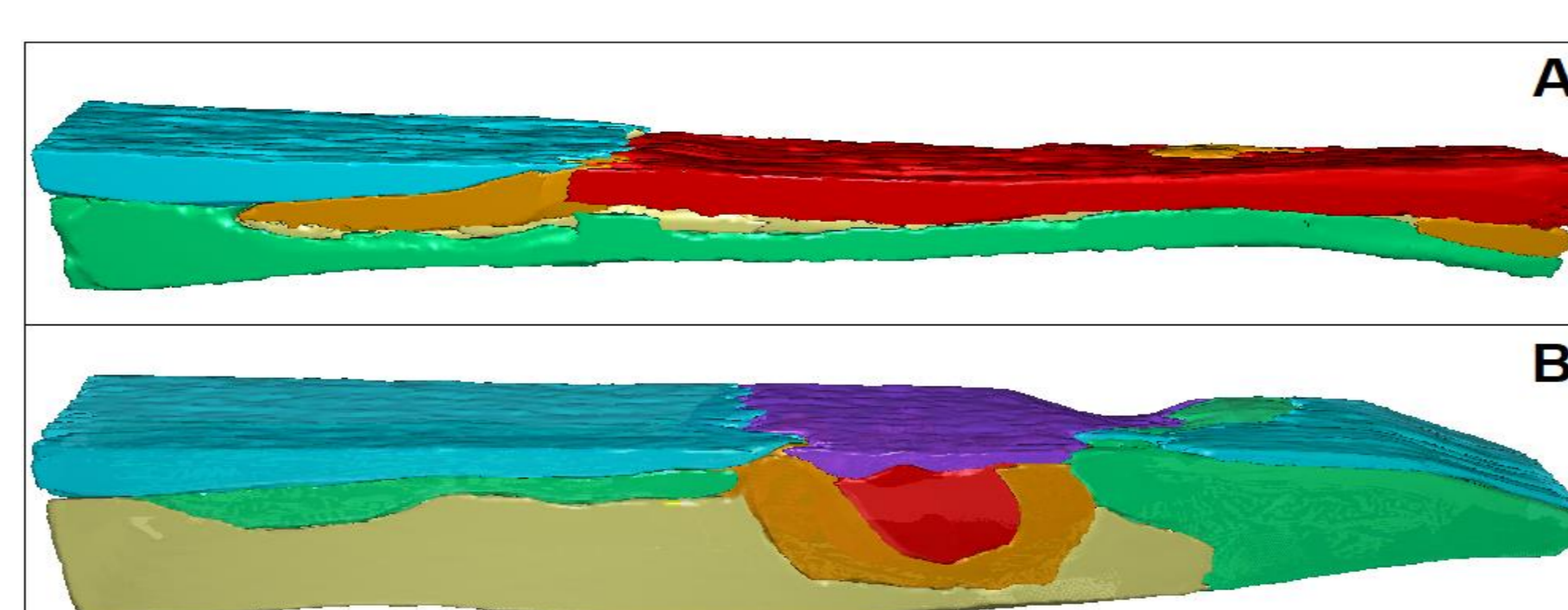


Abb. 3: Dreidimensionale en-bloc-Segmentierungen^[3,4]
En-bloc-Segmentierung der Probe #1 (A) und eine weitere Probe #2 (B) zur Visualisierung des räumlichen Zusammenhangs der CSO analog der zweidimensionalen Segmentierung in Abbildung 2: Superficialzone = blau, Single-Strings-Zone = grün, Double-Strings-Zone = gelb, Small-Clusters-Zone = orange, Large-Clusters-Zone = rot (A+B), Diffuse-Distribution-Zone = violett (B). Interessanterweise präsentiert sich der Knorpeldefekt in Probe #2 nicht flächendeckend mit vertikalem Schweregradienten, sondern fokal konzentriert mit radialem Schweregradienten der Defektzonen und Plomben-artigem Aufsatz einer Zone mit diffuser Zellverteilung in hoher Dichte.

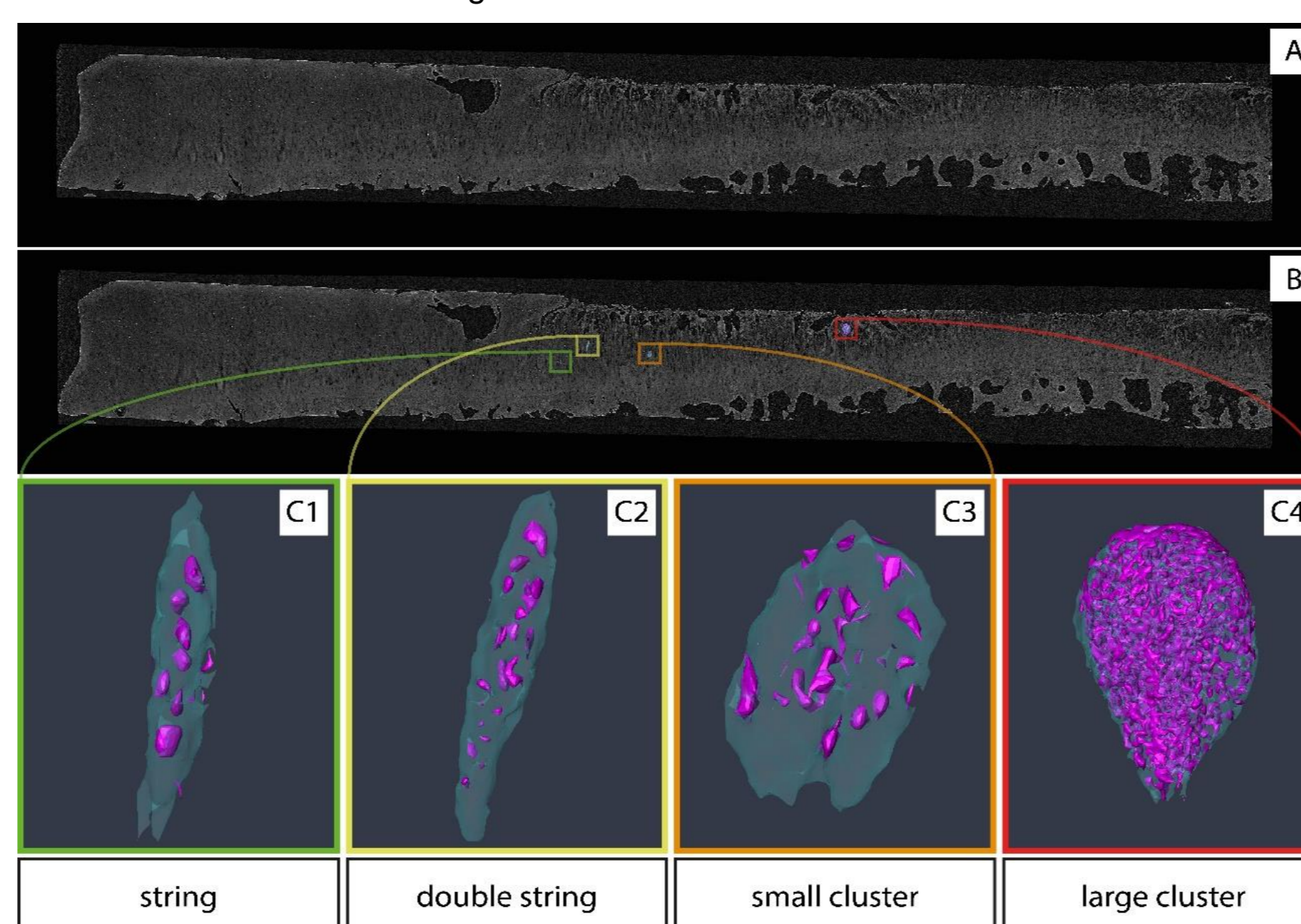


Abb. 4: Lokalisation der CSO am Beispiel der Probe #1^[5]
SR- μ CT-Aufnahme der Probe #1, Seitensicht (A), Seitensicht mit Hervorhebung segmentierter CSO (B); Grossansicht der segmentierten CSO mit farblicher Codierung (C1–4, keine einheitliche Skalierung): cyan-transparent: Matrixlakunen, violett: Nuclei.

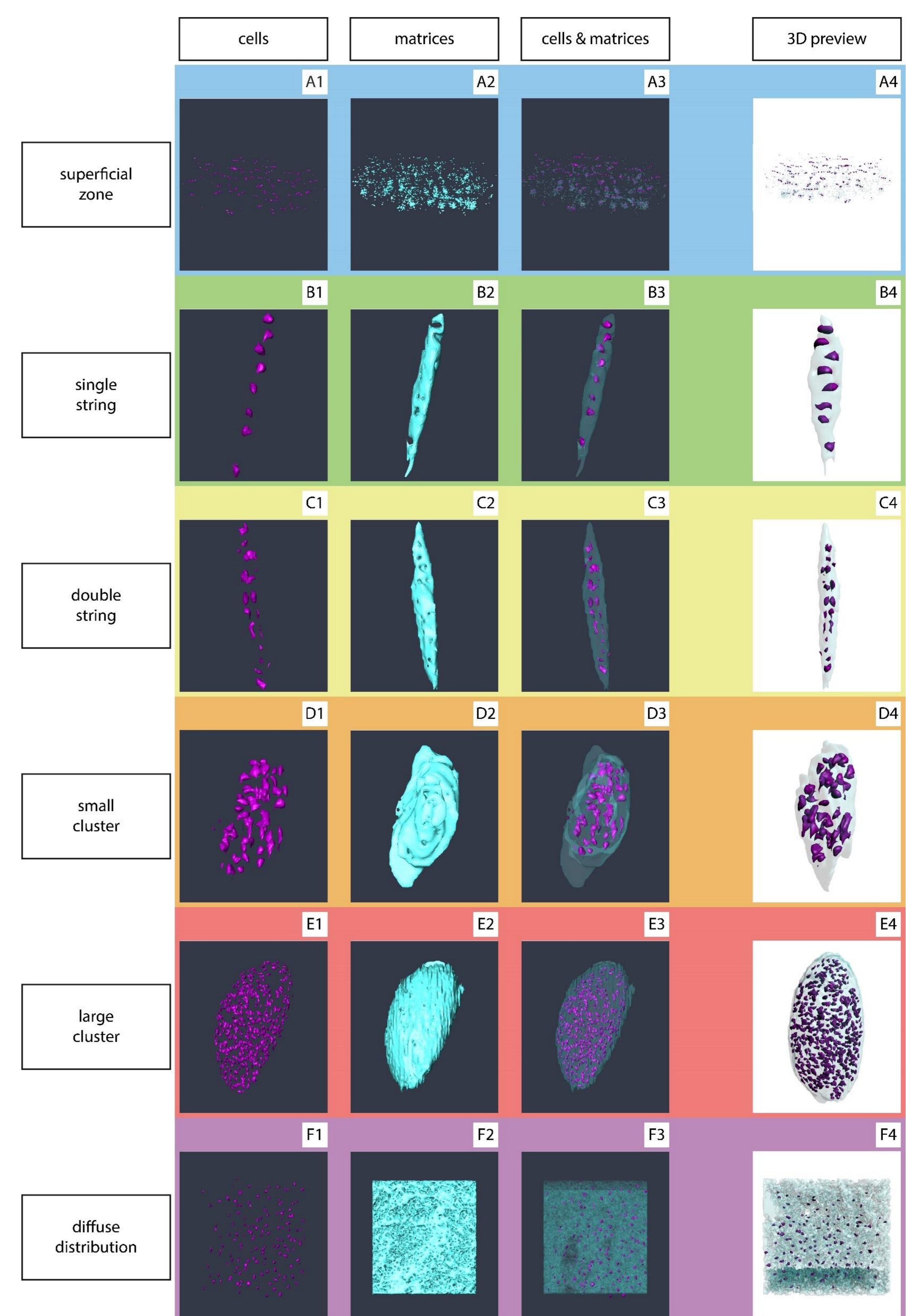


Abb. 5: Übersicht eines segmentierten Vertreters je CSO^[6]
Spalte 1 demonstriert die Nuclei (violett) (A1–F1), Spalte 2 die Matrices (cyan) (A2–F2) und Spalte 3 eine Kombination aus Nuclei (violett) und Matrices (cyan-transparent) (A3–F3). Spalte 4 zeigt Standaufnahmen eines interaktiven 3D-Modells (A4–F4). Zur Segmentation der diffusen Zell-Distribution wurde eine Teilregion in kubischer Form aus der Probe #2 in der entsprechenden Zone definiert (F1–4).

Schlussfolgerung

Diese Pilotstudie belegt den dreidimensionalen Zusammenhang räumlicher Chondrozytenorganisation mit der Knorpeldegeneration. Frühe Veränderungen der Zellorganisation in der superfiziellen Zone sind mit Veränderungen in tieferen Schichten assoziiert. Da Veränderungen von *strings* zu *double strings* bereits ohne makroskopisches Korrelat erkennbar sind, könnte diese Methode als Mittel zur Erkennung früher degenerativer Veränderungen des Knorpels dienen.

Quellenangaben

- Rolauffs, B., et al.: Distinct horizontal patterns in the spatial organization of superficial zone chondrocytes of human joints. *Journal of Structural Biology* 2008, vol. 162 (2), pp. 335–44.
- Felka, T., et al.: Loss of spatial organization and destruction of the pericellular matrix in early osteoarthritis in vivo and in a novel in vitro methodology. *Osteoarthritis and Cartilage* 2016, vol. 24 (7), pp. 1200–9.
- Figure created by Beutler, K.R., by the use of "Top-down (A) and side view (B,C) of cartilage specimen I and the corresponding SR- μ CT image rendering (D)", by Danalache, M., et al., from **Exploration of changes in spatial chondrocyte organisation in human osteoarthritic cartilage by means of 3D imaging**. *Scientific Reports* 2021, Springer Nature (07.05.2021). URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-89582-w/figures/3>. Copyright © 2021, The Author(s). Licensed by CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).
- Figure created by Beutler, K.R., by the use of "Top-down (A) and side view (B,C) of cartilage specimen III and the corresponding µCT image rendering (D)", by Danalache, M., et al., from **Exploration of changes in spatial chondrocyte organisation in human osteoarthritic cartilage by means of 3D imaging**. *Scientific Reports* 2021, Springer Nature (07.05.2021). URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-89582-w/figures/5>. Copyright © 2021, The Author(s). Licensed by CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).
- Figure created by Beutler, K.R., by the use of "Identification of individual patterns in a cartilage data set", by Danalache, M., et al., from **Exploration of changes in spatial chondrocyte organisation in human osteoarthritic cartilage by means of 3D imaging**. *Scientific Reports* 2021, Springer Nature (07.05.2021). URL: https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1038%2Fs41598-021-89582-w/MediaObjects/41598_2021_89582_MOESM1_ESM.pdf. Copyright © 2021, The Author(s). Licensed by CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).
- Figure created by Beutler, K.R., by the use of "Spatial chondrocyte patterns imaged by µCT", by Danalache, M., et al., from **Exploration of changes in spatial chondrocyte organisation in human osteoarthritic cartilage by means of 3D imaging**. *Scientific Reports* 2021, Springer Nature (07.05.2021). URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-89582-w/figures/1>. Copyright © 2021, The Author(s). Licensed by CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).