

GEFÄSS-GEWEBE-TRANSPORT VON WIRKSTOFFEN BESCHICHTETER IMPLANTATE: MODELLIERUNG DER TRANSPORTVORGÄNGE

TOBIAS KLEPSCH, HENRIK BOTTERWECK

Einleitung

Wirkstoffbeschichtete Knochenimplantate ermöglichen die lokale Applikation von Medikamenten und bioaktiven Substanzen, die eine verbesserte Knochenheilung bewirken oder das Infektionsrisiko senken sollen (1). Die lokale Applikation ermöglicht eine direkte Wirkung der Substanzen in optimierter Dosierung unter Umgehung des systemischen Kreislaufs. Dadurch wird ein Abbau des Wirkstoffes in Leber oder Nieren vor Erreichen des Wirkorts verhindert.

Um die Effektivität eines beschichteten Implantats beurteilen zu können, muss einerseits die Ablösung des Wirkstoffes vom Implantat und andererseits die Aufnahme dieses Wirkstoffes ins umgebende Gewebe messbar gemacht werden. Zur Reduktion teurer Prototypen und deren Testung im Tiermodell, ist die numerische Modellierung mithilfe von mathematischen Methoden wie der Methode der Finiten Elemente ein vielversprechendes Feld. Allerdings sind derartige Modelle nur mithilfe von physikalischen Experimenten aussagekräftig. Zwar kann die Richtigkeit der Lösungen der angewendeten Berechnungen, die sogenannte Verifizierung, anhand von Tests und Konvergenzanalysen gezeigt werden. Welche Fehler aber bereits bei der Auswahl der Gleichungen zur Modellierung gemacht wurden, kann nur durch Experimente, die Validierung, untersucht werden.

Bisher wurden simplifizierte In-vitro-Modelle der Wirkstoffabgabe u. a. in Form des Blattrührapparates entwickelt (2). Hierbei wird das Implantat in eine Standardlösung unter kontrollierten Bedingungen wie Temperatur und pH-Wert gebracht. Die Konzentration des Wirkstoffes in der Lösung wird in regelmäßigen Abständen gemessen und so die Wirkstoffablösung als Funktion der Zeit angegeben. Ein Zusammenhang zwischen derartigen Modellen und den komplexen Vorgängen in-vivo wurde allerdings bisher noch nicht im Detail nachgewiesen. Ebenfalls liefert ein derartiges Modell keine Information über den Wirkstofftransport in den beteiligten Geweben. Das beschichtete Implantat wird jedoch in ein komplexes biologisches Umfeld implantiert, in dem eine große Vielzahl hochgradig nichtlinearer Prozesse auftreten (3). Dabei spielen vor allem die Knochenheilung und die Osseointegration, also das Anhaften neu gebildeter Knochenzellen an die Implantatoberfläche, eine Rolle (4). Diese Prozesse können bisher in einfachen experimentellen Aufbauten nicht abgebildet werden.

Bisherige In-silico Modelle wie z. B. (5, 6, 7, 8) modellieren die verschiedenen Phasen der Knochenheilung. Diese Modelle sind aber weniger geeignet, den Prozess der Wirkstoffablösung und Wirkstoffausbreitung zu beschreiben, da sie keine Modellierung der Barriere vornehmen, die sich zwischen Implantatoberfläche und dem umliegenden Gewebe ausbildet. Die Knochenheilung bewirkt ständige Änderungen dieser Barriere, sodass sich ihr Einfluss auf die Wirkstoffausbreitung laufend verändert. Um die Umbildung dieser Gewebeschichten zu untersuchen, wurde in der Vergangenheit der Ablauf der Knochenheilung vor allem im Tiermodell verfolgt. Hierbei wurde eine bioaktive Substanz wie knochenmorphogenetische Proteine (englisch bone morphogenetic protein, BMP) in-vivo injiziert und zu festgelegten Zeitpunkten Gewebeproben aus den jeweiligen Versuchstieren entnommen. Dabei wurden insbesondere der Kallusdurchmesser, die Knochenmineraldichte und die biomechanische Steifigkeit gemessen (9, 10). Diese Modelle liefern demnach wichtige Informationen zum Ablauf der Knochenheilung. Allerdings wurden dabei nicht die Ausbreitung des Wirkstoffes und auch nicht deren Zusammenhang mit den Gewebeeigenschaften untersucht.

Neben den Computermodellen ist ebenso die Ausarbeitung von experimentellen Methoden zur Verifikation der Modelle erforderlich. Experimentelle Methoden wie die Immunohistologie sind zumindest partiell destruktiv und mit großem Aufwand bei der Probengewinnung und Aufbereitung verbunden. Die Entwicklung zerstörungsfreier Prüfverfahren ist daher mit großen Hoffnungen verbunden. Viele Verfahren sind für die Bildgebung des Knochens nicht geeignet (z. B. Sonographie) oder können die erforderliche Ortsauflösung derzeit nicht erreichen. Röntgen ist ein lange bekanntes Verfahren, das eine ausreichende Durchdringungsfähigkeit für den Knochen aufweist. Um die Verteilung einer Substanz in drei Dimensionen zu erfassen, ist allerdings konventionelles 2D-Röntgen nicht ausreichend und daher wird Röntgencomputertomographie benötigt.

In diesem Projekt wird daher ein zweiteiliger Ansatz verfolgt. Einerseits werden Modelle für die Transportvorgänge im Gewebe entwickelt, die computergestützte Simulationen zu ihrer Lösung einsetzen. Weiterhin wird ein Verfahren mit Mikro-Computertomographie (MikroCT) eingesetzt, um hochaufgelöste Tomogramme des Knochens zu erzeugen, während ein Röntgenkontrastmittel als Modellwirkstoff

eingesetzt wird. Mithilfe der MikroCT sind dreidimensionale Aufnahmen des Knochengewebes möglich, sodass die Verteilung des Kontrastmittels untersucht werden kann. Langfristig soll demnach die stetige Verbesserung von Simulation und Experiment in mehreren Iterationsschritten erfolgen, um die Problematik der Wirkstoffausbreitung umfassender zu verstehen und beschreiben zu können.

Im ersten Schritt wurde ein abstrahiertes simplifiziertes Finite-Elemente-Modell entwickelt, dass sich auf gewebespezifische Daten aus der Literatur stützt. So wurde ein auf dem Markt befindlicher mit dem Antibiotikum Gentamicin beschichteter intramedullärer Nagel (11) analysiert und in ein abstraktes Modell umgesetzt, um die bei der Wirkstoffablösung zu erwartenden Gewebekonzentrationen einschätzen zu können (12). Das Modell beschreibt die Ausbreitung als reines Diffusionsproblem und weist fünf verschiedene zylindersymmetrische Kompartimente auf: Wirkstoffbeschichtung, Blutgerinnsel, Markraum, Trabekularknochen und Kortikalis. Die folgende Abbildung zeigt den schematischen Aufbau des Modells als 2D-achsensymmetrisches Modell:

Das Modell wurde in der Simulationssoftware COMSOL

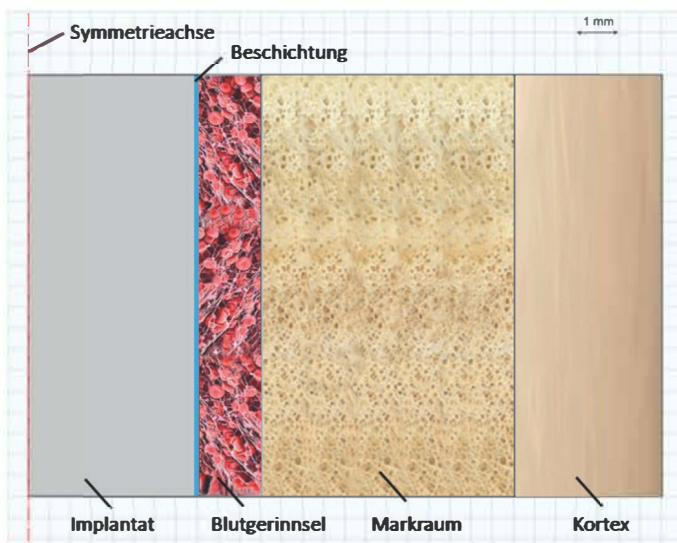


Abb. 1. Schematische Darstellung des in COMSOL Multiphysics implementierten 2D-achsensymmetrischen Modells

Multiphysics implementiert und für ein simuliertes Zeitintervall von 28 Tagen gelöst (COMSOL Multiphysics, Version 4.4, 2014, COMSOL AB, Schweden). Mithilfe des Modells kann einerseits die zeitliche Änderung der Wirkstoffkonzentrationen in den Kompartimenten dargestellt werden, weiterhin wird auch die Gesamtwirkstoffmenge in den Kompartimenten berechnet und im zeitlichen Verlauf dargestellt werden.

Das Versuchsverfahren ist so aufgebaut, dass nacheinander vollständige CT-Aufnahmen des Probenobjekts gemacht

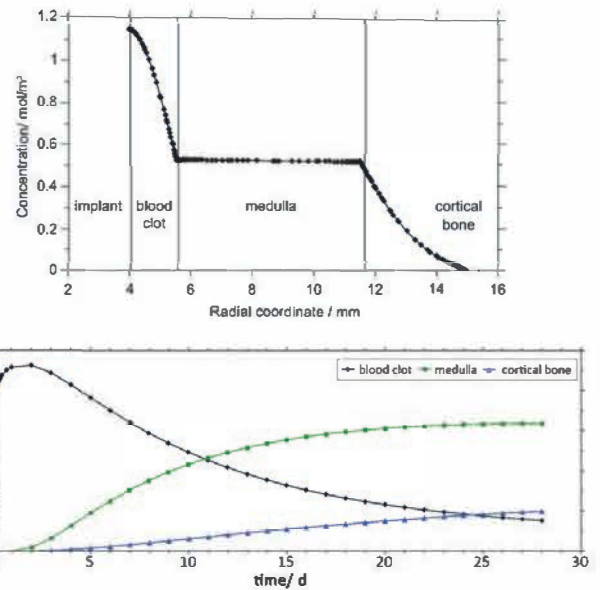


Abb. 2. Konzentrationsprofil in verschiedenen Bereichen zum simulierten Zeitpunkt 28 Tage (oben). Zeitliche Veränderung der Wirkstoffmenge im Blutgerinnsel, dem Markraum und der Kortikalis (unten).

werden. Das verwendete Kontrastmittel ist jodhaltig und hat dadurch je nach Konzentration eine höhere Röntgenschwächung als das Gewebe, sodass es von diesem zu unterscheiden ist. Um das Verfahren zunächst zu erproben sind Messobjekte erforderlich, die im Gegensatz zu Knochenproben eine hohe Homogenität aufweisen und inert sind, sodass das Objekt für die Dauer der Messung keine Änderung seiner Eigenschaften zeigt. Daher fiel die Wahl auf eine gesinterte Stützstruktur aus Hydroxylapatit (englisch: Scaffold). Dieser Scaffold hat eine offene Mikroporosität und ist somit in gewissem Sinne eine Nachbildung einer Knochenstruktur. Ferner tritt das Mineralsalz Hydroxylapatit in im Knochen auf.

Der Scaffold wurde zunächst mit einer zentralen Kavität versehen, in die später das Kontrastmittel eingebracht wurde. Im MikroCT wurde sodann eine Vorrichtung montiert, in der der Scaffold mit Flüssigkeit getränkt wurde, sodass das Kontrastmittel durch die offene Porosität des Objekts diffundieren kann.

Die Messung wurde am MikroCT des Labors für Medizinische Bildgebung der FH Lübeck durchgeführt (GE nanotom M, GE Phoenix Xray, Wunstorf, Deutschland). Für die Aufnahmen wurden eine Spannung von 150 kV und eine Stromstärke von 50 μ A bei einer Voxelgröße von 50 μ m verwendet. Die Dauer einer Messung betrug 8:30 Minuten und jeweils nach Ablauf von 10 Minuten wurde eine neue Messung gestartet. Die Rekonstruktion der Aufnahmen erfolgte mit einem proprietären modifizierten Feldkamp-Algorithmus (GE datos|reconstruction, Version 2.3, GE Phoenix Xray).

Um die durch die CT-Messung erhaltenen Grauwerte einer Konzentration des Kontrastmittels zuordnen zu können,

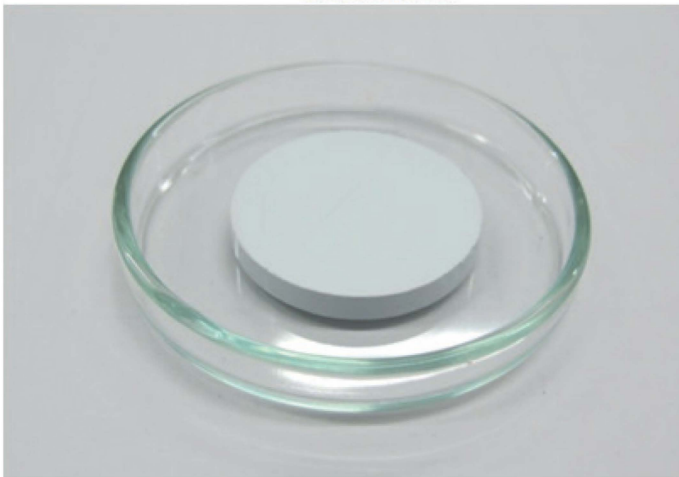
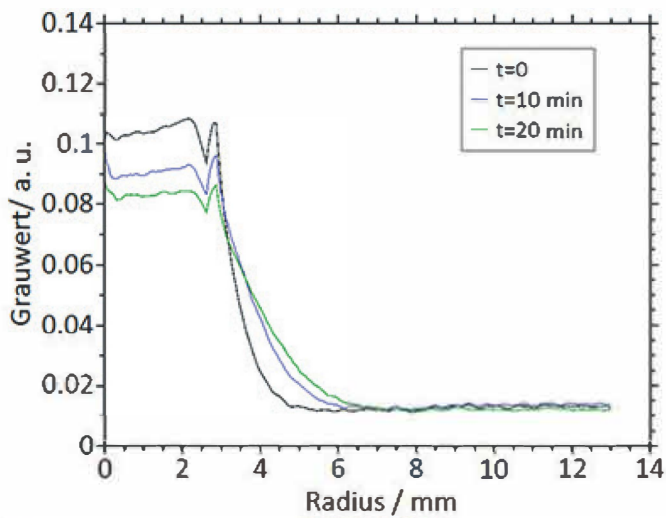


Abb. 3. Gesinterter Hydroxylapatit-Scaffold mit einem Durchmesser von 25 mm (unten, zur Verfügung gestellt durch Pharmazeutisches Institut, Christian-Albrechts-Universität, Kiel). Das Diagramm zeigt die rekonstruierten Grauwerte für drei Messungen mit den Startzeitpunkten 0, 10 und 20 Minuten nach Applikation des Kontrastmittels. Die Kurven stellen radiale gemittelte Profile vom Zentrum der Kavität zum Rand des Scaffolds dar. Ein leichter Anstieg der Kurven ist durch auftretende Strahlaufhärtung verursacht.

sind Kalibriermessungen erforderlich. Allerdings ist es nicht ausreichend, eine Kalibrierung derart durchzuführen, dass ein Reagenzglas mit unterschiedlichen Konzentrationen des Kontrastmittels befüllt und der Grauwert im aufgezeichneten Röntgenbild als Vergleichsmaßstab herangezogen wird. Aufgrund der Gesamtschwächung des Scaffolds, ist ein direkter Vergleich so nicht möglich. Daher wurden auch Messungen durchgeführt, bei denen bekannte Konzentrationen eines Kontrastmittels in die Kavität eines Scaffolds eingeführt wurden und diese aber nach außen versiegelt wurden. Die verschiedenen Einflussfaktoren, die das Ergebnis der Kalibrierung beeinflussen sind Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten. Zu nennende Unsicherheiten sind vor allem der Einfluss von Messrauschen, Unsicherheiten in der Bestimmung der Grenzfläche

zwischen Kavität und Scaffoldmaterial, sowie mögliche Positionsabweichungen des Messobjektes von Messung zu Messung.

Als Modell für einen Knochen ist der Scaffold nur bedingt geeignet, da er keinerlei organisches Material wie Zellen beinhaltet, die den Großteil des Knochengewebes ausmachen. Der Scaffold dient daher vor allem als Prüfobjekt, um das Messverfahren mit MikroCT auf seine Eignung zu überprüfen. Zukünftig sind Messungen mit Knochenproben ex vivo geplant, sodass hier ein realistischeres Modell der Transportvorgänge im Knochen erreicht werden soll.

Diskussion

Mit dem simplifizierten Simulationsmodell eines intramedullären Nagels konnten erste Abschätzungen für die Wirkstoffverteilung im Gewebe bei rein diffusivem Transport erhalten werden. Da in diesem Modell die zeitliche Änderung von Geweben durch die Knochenheilung nicht berücksichtigt wurde, kann es als erste Abschätzung angesehen werden. So ist beispielsweise die Bildung des Blutgerinnsels nach enden der Blutung zeitlich verzögert. Einen Vorschlag dazu liefert (13). Ebenfalls wurden eine Konzentrationsabhängigkeit und die Anisotropie des Diffusionskoeffizienten nicht berücksichtigt. Weiterhin wurde in diesem Modell die Ablösung des Wirkstoffs aus dem Implantat rein durch Diffusion gesteuert modelliert. Die Anwendung einer ggf. bekannten Ablösungs-Zeit-Funktion für den Wirkstoff aus dem Implantat ist möglich. Im Vordergrund stand hier die grundsätzliche Herangehensweise mit der Modellierung in Kompartimenten und der Prüfung der Simulationssoftware für den Zweck der Modellierung des Problems. Das Programm ist auf die Einbeziehung des Zusammenspiels verschiedener physikalischer Effekte ausgelegt und verleiht dem Modell dadurch eine hohe Erweiterbarkeit.

Die grundsätzliche Machbarkeit des Messverfahrens aus Verbindung von MikroCT und Kontrastmittel als Modellwirkstoff konnte gezeigt werden. Eine weitergehende Analyse der genauen quantitativen Beziehungen zwischen Grauwerten und resultierender Kontrastmittelkonzentration sind erforderlich und Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten. Messungen an Knochenproben sollen zudem die Anwendbarkeit auf diese Proben zeigen und das Modell zu einem realistischeren Szenario überführen.

Langfristig zielt die Verbindung von Simulation und experimentellem Verfahren auf eine realistischere Modellierung der Transportvorgänge der Wirkstoffe beschichteter Implantate ab und soll helfen, die Entwicklungszyklen derartiger Implantate zu verkürzen und die Patientensicherheit zu erhöhen.

Ausblick

Um die Verteilung des Medikaments in heilendem Knochen zu modellieren, müssen die einzelnen Schritte der Knochenheilung hinsichtlich ihrer Dauer und der dabei entstehenden Veränderungen der Transportprozesse charakterisiert werden. Auf der Grundlage dieser Charakterisierung kann dann eine zeitabhängige Funktion entwickelt werden, die eine realistische Abbildung der Vorgänge ermöglicht. Da biologische Gewebe multiskalige Gebilde darstellen, in denen Transportvorgänge in verschiedenen Zeit- und Größenskalen ablaufen, sind für die experimentelle Abstützung von Modellen umfangreiche Daten auf allen Zeit- und Längenskalen erforderlich (14). In Zusammenarbeit mit den Teilprojekten A und C des LUMEN Forschungskollegs ist eine Verbindung zwischen Phänomenologischer Modellierung (Teilprojekt A), der Simulation der Transportvorgänge auf der Gewebeebene (TP B), sowie Modellierung und Messung von Diffusion auf der Ebene von einzelnen Molekülen (TP C) angestrebt.

Danksagung

Diese Publikation ist ein Ergebnis der laufenden Arbeiten in dem vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten. Promotionskolleg LUMEN - Luebeck Medical Engineering der Fachhochschule Lübeck und der Universität zu Lübeck, mit der Förderkennziffer 13 GW 0172 B.

Quellen

- (1) T. Fuchs, G. Schmidmaier, M. J. Raschke, and R. Stange, "Bioactive coated implants in trauma surgery", *Eur. J. Trauma Emerg. Surg.*, vol. 34, pp. 64-68, Apr. 2008.
- (2) European Council, "European Pharmacopoeia, EP 2.9.3 Dissolution test for solid dosage forms", 6th ed., 2001.
- (3) T. A. Einhorn, "The science of fracture healing", *J. Orthop. Trauma*, vol. 19, Suppl., pp. S4-S6, Dec. 2005.
- (4) J. E. Davies, "Understanding peri-implant endosseous healing", *J. Dent. Educ.*, vol. 67, pp. 932-949, Aug. 2003.
- (5) S. J. Shefelbine, P. Augat, and L. Claes, and U. Simon, "Trabecularbone fracture healing simulation with finite element analysis and fuzzylogic", *J. Biomech.*, vol. 38, pp. 2440-2450, Jan. 2005.
- (6) A. Bail'on-Plaza, and M. Van der Meulen, "A mathematical framework to study the effects of growth factor influences on fracture healing", *J.Theor. Biol.*, vol. 212, pp. 191-209, Sep. 2001.
- (7) W. Li, J. D. Gardinier, C. Price, and L. Wang, "Does blood pressure enhance solute transport in the bone lacunar-canalicular system?", *Bone*, vol. 47, no. 2, pp. 353-359, Aug. 2010.

- (8) L. Geris, A. Gerisch, J. Vander Sloten, R. Weiner, and H. Van Oosterwyck, "Angiogenesis in bone fracture healing: a bioregulatory model", *J. Theor. Biol.*, vol. 7, pp. 137-158, Mar. 2008.
- (9) G. Li, G. White, C. Connolly, and D. Marsh, "Cell proliferation and apoptosis during fracture healing", *J. Bone Min. Res.*, vol. 17, pp. 791-799, May 2002.
- (10) A. D. Diwan, A. Leong, R. Appleyard, D. Bhargav, Z. M. Fang, and A. Wei, "Bone morphogenetic protein-7 accelerates fracture healing in osteoporotic rats", *Indian J. Orthop.*, vol. 47, no. 6, pp. 540-546, Nov. 2013.
- (11) T. Fuchs, R. Stange, G. Schmidmaier, and M. J. Raschke, "The use of gentamicin-coated nails in the tibia: preliminary results of a prospective study", *Arch. Orthop. Trauma Surg.*, vol. 131, pp. 1419-1425, May 2011.
- (12) T. F. Klepsch, G. Rau, J. Krieger, H. Botterweck, "Modeling diffusion of gentamicin eluted from a coated intramedullary nail", *Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik*. Volume 59 Track L, Issue s1, S878, ISSN (Online) 1862-278X, ISSN (Print) 0013-5585, DOI: 10.1515/bmt-2014-5011, Oct. 2014.
- (13) C. G. Lee, Y.-C. Wang, and C.-H. Wang, "Simulation of gentamicin delivery for the local treatment of osteomyelitis", *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 91, pp. 622-635, Sep. 2005.
- (14) L. Geris, J. Vander Sloten, and H. Van Oosterwyck, "In silico biology of bone modelling and remodelling: regeneration", *Phil. Trans. R. Soc. A.*, vol. 367, pp. 2013-2053, Apr. 2009.

Autoren

Tobias Klepsch, M. Sc.

Fachhochschule Lübeck

Labor für Medizinische Bildgebung

(korrespondierender Autor)

Universität zu Lübeck

Graduate School for Computing in Medicine and Life Sciences

Mönkhofer Weg 239

23562 Lübeck

E-Mail: tobias.klepsch@fh-luebeck.de

Prof. Dr. Henrik Botterweck

Labor für Medizinische Bildgebung

Fachhochschule Lübeck

IMPRESSUM

HERAUSGEBER

Präsidium der Fachhochschule Lübeck
Mönkhofer Weg 239
23562 Lübeck
www.fh-luebeck.de

REDAKTION

Autoren/-innen
Schlussredaktion:

Prof. Dr.-Ing. Stephan Klein
Labor für Medizinische Sensor- und Gerätetechnik
Fachhochschule Lübeck
www.msgt.fh-luebeck.de

Frank Mindt, M.A.
Pressestelle
Fachhochschule Lübeck
Telefon: 0451 300 - 5305
Fax: 0451 300 - 5470
E-mail: presse@fh-luebeck.de

SATZ UND LAYOUT

Thowo - Thorben Wolkowski
E-mail: info@thowo.de
www.thowo.de

FOTOS

Autoren/-innen, Pressestelle

ISSN 1618 5528

AUFLAGE
600 Exemplare