

Aus dem Julius Wolff Institut
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Influence of endoprosthesis wear on periprosthetic biology

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

M.Sc. Janosch Schoon (geb. Wittke)

aus Bremerhaven

Datum der Promotion: 25.06.2017

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	3
Eidesstattliche Versicherung	5
Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation	6
Auszug aus der <i>Journal Summary List</i>	8
Druckexemplar der ausgewählten Publikation.....	9
Lebenslauf	20
Publikationsliste	22
Danksagung	23

Zusammenfassung

Die Freisetzung von Abriebpartikeln aus Hüftendoprothesen mit einer Metall-Metall-Gleitpaarung (MoM) ist ein klinisches Problem in der Hüftendoprothetik. Die Gleitpaarungskomponenten von MoM-Endoprothesen bestehen aus einer Cobalt-Chrom-Molybdän Legierung (CoCrMo). Die Exposition gegenüber metallischen Abriebprodukten ist mit einer Vielzahl von adversen Effekten assoziiert. Dominante lokale Effekte sind Pseudotumorformationen und aseptische Osteolysen, die zu einer frühzeitigen Lockerung führen und damit die häufigste Indikation zur Revision von MoM-Endoprothesen darstellen. Des Weiteren wurden akute neurotoxische und kardiotoxische Effekte bei erhöhten systemischen Co-Spiegeln beschrieben.

Das erste Ziel der Arbeit war die Bestimmung der lokalen Metallexposition. Das zweite Ziel war es mesenchymale Stromazellen (MSCs) aus dem Knochenmark (KM) von *in vivo* belasteten Patienten zu isolieren und *in vitro* hinsichtlich ihrer Viabilität, Proliferation und ihres Differenzierungspotentials zu untersuchen. MSCs sind Vorläuferzellen von kurzlebigen matrixmineralisierenden Osteoblasten und damit wichtig für die vitale Knochenhomöostase. Das dritte Ziel war es, MSCs von unbelasteten Patienten *in vitro* gegenüber relevanten Mengen Cr(III) und/oder Co(II) auszusetzen und ebenfalls hinsichtlich ihrer Funktionalität zu untersuchen. Die zugrundeliegende Hypothese war, dass Patienten mit MoM-Gleitpaarung lokal gegenüber Cr und Co exponiert sind und sich diese Exposition auf die Funktionalität von MSCs auswirkt.

Für die Bestimmung der lokalen Metallspiegel, mittels Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie, wurde periprothetisches Gewebe, Synovialflüssigkeit und KM während der Revisionsoperation von Patienten mit mindestens einer osteolytischen Läsion entnommen. Die Expositionsbestimmung zeigte, dass Patienten mit MoM-Gleitpaarung sowohl gegenüber partikulärem, als auch gegenüber dissoziiertem Cr und Co exponiert sind. Dissoziiertes Cr und Co wurde in allen lokalen Kompartimenten, inklusive des KM, nachgewiesen. MSCs wurden aus dem KM der belasteten Patienten isoliert und mit MSCs von alters- und geschlechts- korrelierten unbelasteten Patienten verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass *in vivo* exponierte Zellen nicht in ihrer Viabilität, Proliferation, Migrationskapazität und in Ihrem Potential zur chondrogenen und adipogenen Differenzierung eingeschränkt sind. Sie wiesen jedoch ein geringeres osteogenes Potential auf, welches durch eine signifikant verminderte Matrixmineralisierung und erniedrigter zellulärer Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) nachgewiesen wurde. Die *in vitro* Behandlung von MSCs unbelasteter Patienten mit dissoziiertem Cr(III) und Co(II), in nicht zytotoxischen jedoch klinisch relevanten Konzentrationen, bestätigte diese Ergebnisse.

Die beeinträchtigte Osteogenese von MSCs ist sehr wahrscheinlich ein weiterer wichtiger Bestandteil der Pathogenese von Osteolysen. Die erzielten Ergebnisse lassen sich möglicherweise auch auf andere Expositionszenarien, wie die Korrosion von Konussteckverbindungen bei modularen Hüftendoprothesen, übertragen. Um maximale Patientensicherheit zu gewährleisten, sollte bei der präklinischen Testung von Implantatmaterialien nicht nur die Biokompatibilität der Bulk-Materialien, sondern auch die Kinetik und Dynamik von möglichen Abrieb- und Korrosionsprodukten evaluiert werden.

Abstract

The release of wear particles from hip endoprosthesis with metal-on-metal (MoM) bearing remains a clinical problem in hip arthroplasty. Bearing components of MoM-endoprosthesis consist of a cobalt-chromium-molybdenum (CoCrMo) alloy. Exposure to metallic wear products is related to multiple adverse effects. Most dominant local effects are pseudotumor formation and aseptic osteolysis, which leads to early implant loosening and represents the most prevalent indication for revision surgery. Furthermore, acute neurotoxic and cardiotoxic effects were described for patients who exhibit elevated systemic Co-levels.

The first aim of the study was the assessment of local metal exposure. The second aim was isolating mesenchymal stromal cells (MSCs) from bone marrow (BM) of *in vivo* exposed patients and evaluating these cells regarding their viability, proliferation and differentiation capacity *in vitro*. MSCs are the precursors of rather short-lived mineralizing osteoblasts and therefore important for balanced bone homeostasis. The third aim was evaluating the functionality of MSCs from non-exposed patients following *in vitro* treatment with Cr(III) and/or Co(II) in relevant concentrations. The underlying hypothesis was that patients with MoM-endoprosthesis are locally exposed to Cr and Co and this exposure affects the functionality of MSCs.

Graphite furnace atomic absorption spectroscopy was used to determine metal levels in periprosthetic tissue, synovial fluid and BM samples, which were collected during revision surgery of patients, who exhibited at least one osteolytic lesion. Exposure assessment demonstrated that the patients are not only exposed to particulate but also to dissociated metals. Dissociated Cr and Co were detected in all local compartments including BM. MSCs were isolated from BM of exposed patients and compared to sex and age matched non-exposed patients. *In vivo* exposed cells neither reveal differences in viability, proliferation, migration nor in their capacity for chondrogenic or adipogenic differentiation. However, the cells reveal an impaired capacity for osteogenic differentiation, which was quantified by diminished matrix mineralization and diminished cellular alkaline phosphatase (ALP) activity. *In vitro* treatment of MSCs from non-exposed patients with dissociated Cr(III) and Co(II), in non-cytotoxic but clinically relevant concentrations, confirmed these findings.

Impaired osteogenesis of MSCs is most likely one important element in the pathogenesis of osteolysis. The results are potentially conferrable to other relevant exposure scenarios, like the corrosion of taper joints in modular hip implants. In preclinical testing of implant materials, not

only the biocompatibility of the bulk-materials, but also the kinetics and dynamics of possible wear and corrosion products, should be evaluated to ensure maximum patient safety.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Janosch Schoon, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Influence of endoprosthesis wear on the periprosthetic biology* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben ist.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Publikation:

Rakow A*, Schoon J*, Dienelt A, John T, Textor M, Duda G, Perka C, Schulze F, Ode A. **Influence of particulate and dissociated metal-on-metal hip endoprosthesis wear on mesenchymal stromal cells in vivo and in vitro.** Biomaterials. 2016; 98:31-40.

* Equal contribution

Beitrag im Einzelnen:

Konzeption und Studiendesign - 50%

Die Projektidee stammt von GD, FS und CP. Der relevante Beitrag von JS bezieht sich hauptsächlich auf die experimentelle Konzeption und hierbei insbesondere auf die Probenakquise, Expositionsbestimmung und die *in vitro* Methoden. Die Idee im Zuge der Expositionsbestimmung zwischen partikulären und bereits dissoziierten Metallspezies zu unterscheiden stammt von JS. Die Idee, zuerst die Metallexposition in den lokalen Geweben zu bestimmen und auf Basis der relevanten Expositionshöhe *in vitro* Experimente durchzuführen, stammt von JS. Die Idee, *in vivo* belastete Zellen *in vitro* zu untersuchen, stammt von FS.

Studienbezogene Drittmittelakquise - 20%

Die Finanzierung des Projektes wurde in der ersten Phase durch die RMS Foundation (Bettlach, Schweiz) realisiert. Die entsprechenden Forschungsgelder wurden von FS, AD und GD eingeworben. Die zweite Phase der Projektlaufzeit wurde über das Rahel-Hirsch Habilitationsstipendium von AO realisiert. Unter der Betreuung von AO hat JS bei dieser Antragstellung entscheidenden Beitrag geleistet.

Interpretation der Ergebnisse - 25%

Die Interpretation der Ergebnisse, bezüglich der biologischen Relevanz der Effekte, oblag AR, JS, FS und AO zu gleichen Teilen.

Experimentelle Datenerhebung - 70%

JS hat die experimentellen Tätigkeiten bezüglich Metallwertbestimmung durchgeführt. JS hat die experimentellen Tätigkeiten bezüglich *in vitro* Metallexposition durchgeführt. FS hat die elektronenmikroskopische Partikelcharakterisierung durchgeführt. Zellkulturexperimente, nach *in vivo* Metallexposition, wurden zu gleichen Teilen von FS und JS durchgeführt. Primäre- und sekundäre Patientendaten wie Komorbidität, Dauermedikation und Implantatstatus wurden von AR und TJ, mit Unterstützung von FS und JS, erhoben.

Deskriptive Statistik - 100%

Alle Tabellen und Grafiken der Publikation wurden von JS angefertigt.

Explorative Statistik - 50%

Die explorative Statistik wie Signifikantstests und Korrektur der Signifikanzniveaus wurde unter Betreuung von AO von JS und FS durchgeführt.

Schreiben der Publikation - 60%

JS und FS haben den Abstract zu gleichen Teilen geschrieben. JS und FS haben die Einleitung zu gleichen Teilen geschrieben. JS hat den Methodenteil geschrieben. AR hat den Ergebnisteil bezüglich Patientencharakteristik geschrieben. JS hat die übrigen 90% des Ergebnisteils geschrieben. JS und FS haben zu gleichen Teilen die Diskussion geschrieben. JS und AR haben zu gleichen Teilen den Anhang (*supplementary information*) geschrieben.

Kritische Überarbeitung der Publikation - 75%

Im Zuge der Erstellung des Manuskriptes hat JS, seine eigenen, als auch die Korrekturvorschläge der beteiligten Senior- und Koautoren, evaluiert und entsprechend eingearbeitet.

Einreichen der Publikation und Korrespondenz - 100%

Im Auftrag von CP hat JS die Arbeit eingereicht und die Korrespondenz mit dem redaktionellen Team des Verlages übernommen.

Revisionsprozess - 90%

Im Zuge des Revisionsprozesses (*major Revision*) hat JS das *Rebuttal* verantwortet. Sowohl der *revision-letter* als auch die *point-by-point response* wurde von JS unter der Betreuung von AO und GD geschrieben.

Finale Freigabe der Publikation - 50%

Die finale Überprüfung des Manuskriptes wurde zu gleichen Teilen von AR und JS durchgeführt.

Gesamtverantwortung - 60%

JS trägt 60% der Gesamtverantwortung. Ohne seinen entscheidenden wissenschaftlichen Beitrag wäre die genannte Publikation in Ihrer Form nicht entstanden.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Auszug aus der *Journal Summary List*

ISI Web of KnowledgeSM

Journal Citation Reports[®]

WELCOME HELP

2015 JCR Science Edition

Journal Summary List

[Journal Title Changes](#)

Journals from: subject categories **MATERIALS SCIENCE, BIOMATERIALS** [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)

Sorted by:

Journals 1 - 20 (of 33)

Navigation icons: Home, Previous, [1 | 2], Next, End

Page 1 of 2

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title <i>(linked to journal information)</i>	ISSN	JCR Data ⁱ						Eigenfactor [®] Metrics ^j	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor [®] Score	Article Influence [®] Score
<input type="checkbox"/>	1	BIOMATERIALS	0142-9612	95025	8.387	8.978	1.683	757	6.4	0.14853	2.022
<input type="checkbox"/>	2	ACTA BIOMATER	1742-7061	20966	6.008	6.383	1.208	504	4.3	0.05381	1.461
<input type="checkbox"/>	3	ADV HEALTHC MATER	2192-2640	3173	5.760	6.019	1.050	262	2.2	0.01133	1.560
<input type="checkbox"/>	4	J MATER CHEM B	2050-750X	8585	4.872	4.879	0.985	940	1.9	0.02302	0.971
<input type="checkbox"/>	5	BIOFABRICATION	1758-5082	1216	4.702	5.032	0.789	57	2.9	0.00381	1.165
<input type="checkbox"/>	6	EUR CELLS MATER	1473-2262	2798	4.560	5.680	0.653	49	5.1	0.00676	1.520
<input type="checkbox"/>	7	DENT MATER	0109-5641	10324	3.931	4.667	0.674	187	7.2	0.01364	1.039
<input type="checkbox"/>	8	J BIOMED NANOTECHNOL	1550-7033	3718	3.929	3.564	0.901	182	2.8	0.00745	0.584
<input type="checkbox"/>	9	COLLOID SURFACE B	0927-7765	19417	3.902	4.269	0.689	727	4.5	0.03573	0.800
<input type="checkbox"/>	10	MACROMOL BIOSCI	1616-5187	5877	3.680	3.656	0.824	153	5.7	0.01070	0.869
<input type="checkbox"/>	11	BIOMATER SCI-UK	2047-4830	1201	3.614	3.614	1.239	138	1.9	0.00374	0.868
<input type="checkbox"/>	12	MAT SCI ENG C-MATER	0928-4931	11988	3.420	3.338	0.895	696	3.5	0.02091	0.624
<input type="checkbox"/>	13	BIOMED MATER	1748-6041	2230	3.361	3.132	0.338	133	5.1	0.00418	0.686
<input type="checkbox"/>	14	J BIOMED MATER RES A	1549-3296	15442	3.263	3.196	0.819	393	6.4	0.02358	0.731
<input type="checkbox"/>	15	BIOINSPIR BIOMIM	1748-3182	1285	2.891	3.137	0.392	125	4.0	0.00594	1.383
<input type="checkbox"/>	16	J BIOMED MATER RES B	1552-4973	7100	2.881	2.850	0.711	180	6.5	0.01077	0.685
<input type="checkbox"/>	17	J MECH BEHAV BIOMED	1751-6161	4277	2.876	3.152	0.565	285	3.3	0.01469	0.864
<input type="checkbox"/>	18	J MATER SCI-MATER M	0957-4530	9663	2.272	2.592	0.401	269	7.2	0.01206	0.557
<input type="checkbox"/>	19	BIOINTERPHASES	1934-8630	1002	2.105	2.549	0.688	93	4.7	0.00205	0.664
<input type="checkbox"/>	20	ARTIF CELL NANOMED B	2169-1401	290	2.024	2.024	0.636	55	1.6	0.00054	0.287

Journals 1 - 20 (of 33)

Navigation icons: Home, Previous, [1 | 2], Next, End

Page 1 of 2

[Acceptable Use Policy](#)
Copyright © 2017 Thomson Reuters.

 THOMSON REUTERS
Published by Thomson Reuters

Druckexemplar der ausgewählten Publikation

Influence of particulate and dissociated metal-on-metal hip endoprosthesis wear on mesenchymal stromal cells in vivo and in vitro.

Rakow A*, Schoon J*, Dienelt A, John T, Textor M, Duda G, Perka C, Schulze F, Ode A.

* Equal contribution

Abstract

In hip arthroplasty the implants' articulating surfaces can be made of a cobalt-chromium-molybdenum (CoCrMo) alloy. The use of these metal-on-metal (MoM) pairings can lead to the release of wear products such as metallic particles and dissociated metal species, raising concerns regarding their safety amongst orthopedic surgeons and the public. MoM-wear particles are reported to be heterogeneous in their physicochemical properties, are capable of inducing adverse effects on a cellular level and are thought to be involved in relevant clinical problems like aseptic osteolysis. Yet, it remains elusive how MoM-wear affects bone forming cells and their progenitors: bone marrow residing mesenchymal stromal cells (MSCs). This study introduces an assessment of the in vivo exposure to particulate and dissociated Co and Cr and evaluates the effects of MoM-wear on MSCs. The exposure to MoM-wear products in vivo and in vitro leads to a decrease in MSCs' osteogenic matrix mineralization and alkaline phosphatase activity on a cellular and systemic level. In conclusion, MoM-wear products are released in the periprosthetic region and elevate bone marrow Co and Cr concentrations towards levels that impair osteogenic differentiation of MSCs. Therefore, the ongoing use of CoCrMo alloys for articulating surfaces in joint replacement implants needs critical reconsideration.

Biomaterials. 2016 Aug; 98:31-40

Der Artikel ist unter der folgenden URL lesbar:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.04.023>

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Rakow A*, Schoon J*, Dienelt A, John T, Textor M, Duda G, Perka C, Schulze F, Ode A. **Influence of particulate and dissociated metal-on-metal hip endoprosthesis wear on mesenchymal stromal cells in vivo and in vitro.** Biomaterials. 2016; 98:31-40.

* Equal contribution

Impact Factor 2015: 8.387

Schulze F, Dienelt A, Geissler S, Zaslansky P, Schoon J, Henzler K, Guttman P, Gramoun A, Crowe LA, Maurizi L, Vallee JP, Hofmann H, Duda GN, Ode A (2014). **Amino-polyvinyl Alcohol Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles are Suitable for Monitoring of Human Mesenchymal Stromal Cells In Vivo.** Small. 2014;10:4340-51.

Impact Factor 2014: 8.368

Ode A, Schoon J, Kurtz A, Gaetjen M, Ode JE, Geissler S, Duda GN (2013). **CD73/5'-ecto-nucleotidase acts as a regulatory factor in osteo-/chondrogenic differentiation of mechanically stimulated mesenchymal stromal cells.** Eur Cell Mater. 2013; 25, 37-47.

Impact Factor 2013: 4.887

Weist S, Brunkau C, Wittke J, Eravci M, Broedel O, Krause E, Stephanowitz H, Eravci S, Baumgartner A (2010). **Effects of thawing, refreezing and storage conditions of tissue samples and protein extracts on 2-DE spot intensity.** Proteomics. 2010; 10, 1515-1521.

Impact Factor 2010: 4.815

Eravci M, Mansmann U, Broedel O, Weist S, Buetow S, Wittke J, Brunkau C, Hummel M, Eravci S, Baumgartner A (2009). **Strategies for a reliable biostatistical analysis of differentially expressed spots from two-dimensional electrophoresis gels.** J Proteome Res. 2009; 8, 2601-2607.

Impact Factor 2009: 5.132

Broedel O, Krause E, Stephanowitz H, Schuemann M, Eravci M, Weist S, Brunkau C, Wittke J, Eravci S, Baumgartner A (2009). **In-Gel 18O labeling for improved identification of proteins from 2-DE Gel spots in comparative proteomic experiments.** J Proteome Res 8, 3771-3777.

Impact Factor 2009: 5.132

Danksagung

Im Zuge des Promotionsvorhabens habe ich von der Mitarbeit vieler Kollegen im Umfeld des Julius Wolff Institutes (JWI) und des Centrums für Muskuloskeletale Chirurgie (CMSC) der Charité - Universitätsmedizin profitiert. Hierfür möchte ich mich auch auf diesem Wege bedanken.

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Professor Dr.-Ing. Georg Duda für seine umfangreiche Unterstützung und seinen fachlichen Rat.

Mein Dank gilt Dr. Andrea Ode für die Betreuung. Insbesondere möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, dass ich meine Ideen jederzeit in dieses Projekt einbringen und umsetzen konnte.

Professor Dr.med. Carsten Perka und Anastasia Rakow danke ich für die Hervorhebung der klinischen Relevanz des Themas. Dies ist eine wichtige Säule des Projektes und damit auch meiner Promotionsarbeit.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Frank Schulze für die Initiierung des Projektes. Ohne seinen signifikanten Beitrag in der ersten Phase der Projektlaufzeit, seine Ideen und seine fachliche Kompetenz wäre diese Arbeit nicht entstanden.

Mein Dank gilt Dr. Sven Geißler und seiner Arbeitsgruppe. Hier sind insbesondere Dr. Anke Dienelt, Dr. Simon Reinke, Dr. Andrea Sass, Martin Textor, Dr. Taimoor Qazi, Dorit Jacobi und Antje Blankenstein zu nennen. Vielen Dank für das tolle Umfeld!

Ich bedanke mich bei meiner Frau Christiane Schoon.