

Aus der  
Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik  
Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie an der  
Universität Tübingen

**Die in vitro Zellularität humaner Bandscheibenzellen  
unter simulierten entzündlichen Bedingungen und  
antiphlogistischer Therapeutika als Funktion der  
perizellulären Matrix**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Bauer, Melina**

**2021**

Dekan:

Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter:

Professor Dr. B. Rolauffs

2. Berichterstatter:

Privatdozentin Dr. S. Ehnert

Tag der mündlichen Disputation:

03.03.2021

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1	Anatomie	5
1.1.1	Einordnung der Bandscheibe in den Wirbelsäulenapparat	5
1.1.2	Aufbau der humanen Bandscheibe	6
1.1.3	Die extrazelluläre Matrix	9
1.1.4	Zellen in der humanen Bandscheibe	12
1.2	Biomechanik	14
1.3	Alterungsprozesse und Degeneration	15
1.4	Entzündungsreaktion und Immunantwort	18
1.4.1	Das Komplementsystem	18
1.4.2	Apoptose	19
1.4.3	IL-1 $\beta$	20
1.4.4	Symptomatische Therapie	21
1.4.5	Operative Verfahren	23
1.5	Zielsetzung der Arbeit	24
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>25</b>
2.1	Material	25
2.1.1	Chemikalien	25
2.1.2	Zellkulturmedium und Puffer	26
2.1.3	Enzyme und Proteine	26
2.1.4	Medikamente	27
2.1.5	Lösungen	27
2.1.6	Verbrauchsmaterialien	28
2.1.7	Geräte	29
2.1.8	Software	30
2.1.9	Humanes Bandscheibengewebe	30
2.2	Methoden	31
2.2.1	Zellkultur	31
2.2.2	Wachstumsverhalten	36
2.2.3	Auswertung der Gewebeproben	38
2.2.4	Statistische Auswertung	40
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>40</b>
3.1	Wachstumskurve mit/ohne PCM	40
3.1.1	Datenanalyse des untersuchten Patientenkollektivs	40
3.1.2	Veränderung der Zellanzahl mit / ohne PCM	44
3.2	Zellularität unter medikamentösem Einfluss	50
3.2.1	Datenanalyse des untersuchten Patientenkollektivs	50
3.2.2	Wachstumsverhalten	54
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>57</b>
4.1	Die perizelluläre Matrix hat einen Einfluss auf die Zellularität der Bandscheibenzellen	58
4.2	Der Degenerationsgrad des Ursprungsgewebes hat keinen Einfluss auf die Zellularität der Bandscheibenzellen	59
4.3	Die Rolle antiphlogistischer Therapeutika auf die Zellularität von Chondrozyten	61
4.4	Der Effekt von IL-1 $\beta$ auf die Zellularität unter medikamentöser antiphlogistischer Exposition	62

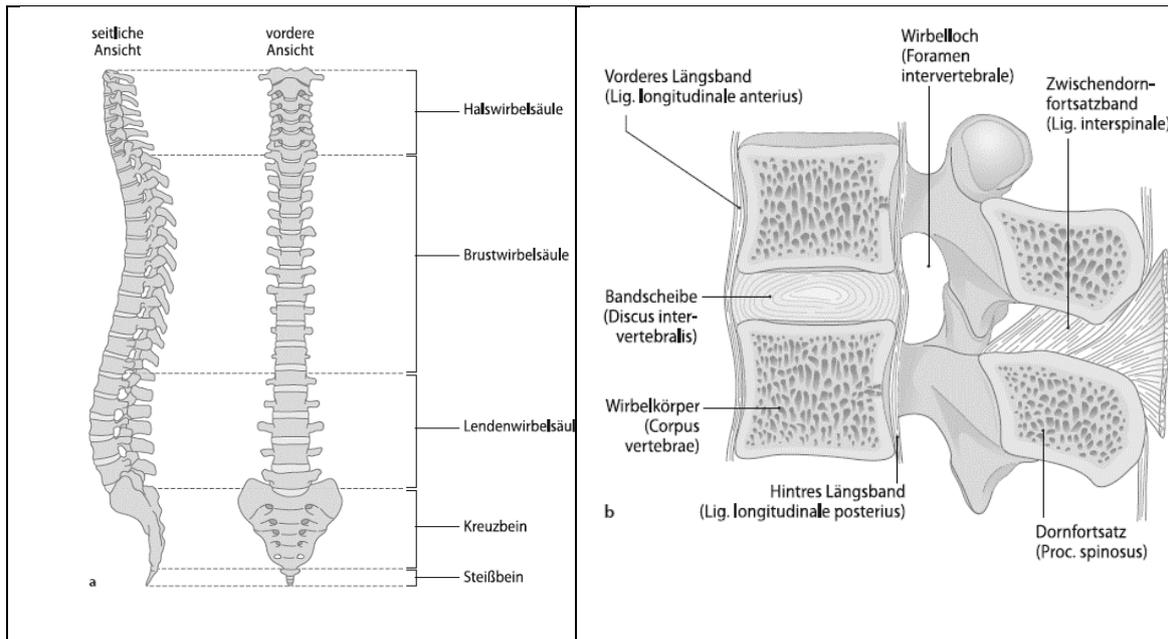
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>67</b>
6.1	Abkürzungen.....	67
6.2	Einheiten- und Größenordnungen.....	68
<b>7</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>70</b>
<b>8</b>	<b>Firmenverzeichnis.....</b>	<b>72</b>
<b>9</b>	<b>Aufklärungsbogen.....</b>	<b>76</b>
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>79</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>82</b>
<b>12</b>	<b>Erklärung .....</b>	<b>83</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Anatomie

### 1.1.1 Einordnung der Bandscheibe in den Wirbelsäulenapparat

Die Wirbelsäule bildet das Achsenskelett und garantiert durch ihren Aufbau die Beweglichkeit des Rumpfes, sowie die Dämpfung axialer Stöße (G. Aumüller, 2006). Auf Grund der Morphologie und Lokalisation der Wirbel (R.L. Drake, 2007) lässt sich die Wirbelsäule in Halswirbelsäule (Pars cervicalis, HWK1-HWK7), Brustwirbelsäule (Pars thoracalis, BWK1-BWK12), Lendenwirbelsäule (Pars lumbalis, LWK1-LWK5) und die zum Kreuzbein (Os sacrum) verschmolzenen Sakralwirbel (SWK1-SWK5) mit rudimentär angelegtem Steißbein (Os coccygis), bestehend aus 3-5 Segmenten, unterteilen (Abbildung 1). Die charakteristische Doppel-S-Form entsteht aus vier aufeinanderfolgenden Krümmungen in der Sagittalebene. Hierbei weisen die Hals- und Lendenwirbelsäule eine nach ventral konvex (Lordose) und die Brustwirbelsäule, sowie das Kreuzbein eine nach dorsal konvexe Krümmung (Kyphose) auf (G. Aumüller, 2006). Die Bandscheiben liegen als knorpelige Gelenkverbindungen (Synchondrosen) zwischen den insgesamt 24 freien Wirbelkörpern und verbinden diese stabil miteinander (G. Aumüller, 2006). Hiervon ausgenommen sind die beiden ersten Halswirbel (Atlas und Axis), zwischen denen echte Gelenke (Diarthrosen) ausgebildet sind (G. Aumüller, 2006). Die Bandscheibe besteht aus drei morphologisch unterschiedlichen (Richardson et al., 2007), voneinander abhängigen Gewebearten (Kandel et al., 2008): Die Grund- und Deckplatte aus hyalinem Knorpel, welche die kortikale Knochenoberfläche der darüber- und darunterliegenden Wirbelkörper bedeckt, der Annulus fibrosus, ein äußerer bindegewebsartiger Ring der den zentral gelegenen, unter Quelldruck stehenden (Heyde, 2006) gallertartigen Kern (Nucleus pulposus) umschließt (Richardson et al., 2007). Die Bandscheibe gewährleistet Bewegungsfreiraum (Flexion, Extension und Rotation) in dem ansonsten starren anterioren Abschnitt der Wirbelsäule (Roberts et al., 2006).



**Abbildung 1. Aufbau der Wirbelsäule und der Wirbelsäulensegmente.** Aufbau der Wirbelsäule von vorne und von der Seite (A). Aufbau der Wirbelsäulensegmente mit angrenzenden anatomischen Strukturen (B). (Bühren and Josten, 2013). Abbildung aus „Die Chirurgie der verletzten Wirbelsäule“ Springer Verlag mit Erlaubnis.

### 1.1.2 Aufbau der humanen Bandscheibe

#### Die Grund- und Deckplatte

Die Grund- und Deckplatte der Bandscheibe stellt die Begrenzung (Heyde, 2006) und den Übergang zu den kranial und kaudal liegenden kortikalen Knochenoberflächen der Wirbelkörper dar (Roberts et al., 2006) und ist mit den kollagenen Fasern des Annulus fibrosus fest verwachsen (Wei et al., 2014). Eine verkalkte Knorpelschicht bildet ca. 90% der Schnittstellen zwischen der Bandscheibe und dem angrenzenden Wirbelkörper.

Die aus dem Mesoderm entstehende Grund- und Deckplatte nimmt zum Zeitpunkt der Geburt etwa 50% des Zwischenwirbelraumes ein. Die dicke Knorpelschicht ist mit einer Vielzahl an Gefäßkanälen durchzogen, die sich kurz nach der Geburt mit Extrazellulärmatrix füllen. Im Laufe der ersten Lebensdekade füllen sie sich vollständig, sodass keine Hohlräume verbleiben. Die Grund- und Deckplatte fungiert beim Heranwachsenden als

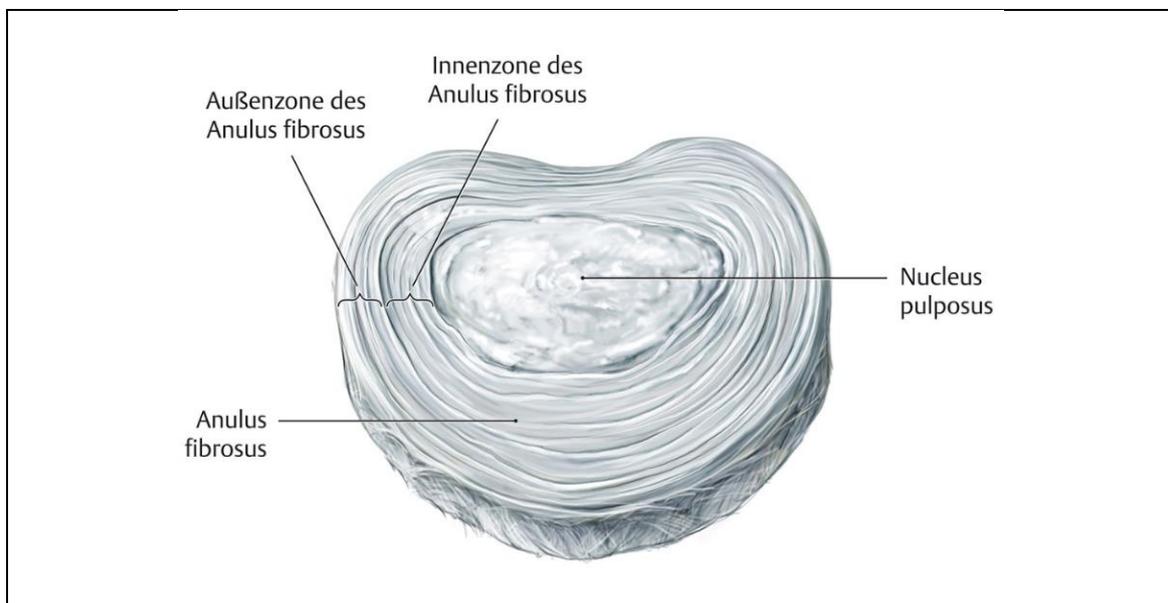
Wachstumsplatte für den angrenzenden Wirbelkörper und ähnelt in seiner Struktur den Epiphysenfugen langer Röhrenknochen. Im Laufe der skelettalen Reifung geht diese Struktur verloren. Der einnehmende Platz im Zwischenwirbelraum reduziert sich im Erwachsenenalter auf etwa 5% (Roberts et al., 2006). Die verbleibende, aus hyalinem Knorpel und Faserknorpel bestehende, 0,6mm dicke Schicht dient als semipermeable Membran, welche die passive Diffusion zur Ernährung der Bandscheibe erleichtert. Die Extrazellulärmatrix ist vergleichsweise reich an Kollagen, enthält jedoch weniger Proteoglykane und Wasser, als die benachbarten Strukturen der Bandscheibe (Wei et al., 2014).

#### Der Annulus fibrosus

Der äußere Faserring (Annulus fibrosus) besteht aus dichtgepackten Kollagenfasern (Fibrillen), hauptsächlich vom Kollagen Typ I, die in 15-25 konzentrisch geschichteten Lamellen angeordnet sind (Richardson et al., 2007). Die scheibchenartig organisierten Kollagenfasern liegen parallel zueinander und im 60° Winkel zur vertikalen Achse, wobei benachbarte Lamellen entgegengesetzt ausgerichtet sind (Wei et al., 2014) und somit ein stabiles Scherengitter bilden (Heyde, 2006). Hierdurch wird ein gleichmäßiger Druck auf den Nucleus pulposus ausgeübt, der eine Aussprossung oder ein Austritt des unter Quellsdruck stehenden Nucleus verhindert (Zhang et al., 2016a). Zwischen den einzelnen Lamellen befinden sich elastische Fasern, sowie Proteoglykane (Richardson et al., 2007). Es kann ein äußerer (äußerer Annulus) von einem inneren (innerer Annulus) Bereich abgegrenzt werden. Die Verankerung des Annulus fibrosus erfolgt in den äußeren Lamellen durch einstrahlende Sharpeyfasern der knöchernen Randleisten, die tiefer liegenden Lamellen sind im Hyalinknorpel der Deckplatte der Wirbelkörper fixiert. (Heyde, 2006). Der vergleichsweise ungeordnete innere Annulus ist durch eine dünne Gewebeschicht, der so genannten Übergangszone, vom Nucleus pulposus getrennt (Wei et al., 2014), geht jedoch ohne scharfe Begrenzung in diesen über (G. Aumüller, 2006). Der Annulus fibrosus entstammt dem Mesoderm und

weist zum Zeitpunkt der Geburt einige Blutgefäße, sowie Nerven auf, die zwischen den Lamellen verlaufen. Beide Strukturen sind in verringerter Anzahl im Bereich der äußeren Millimeter des Annulus fibrosus einer gesunden, erwachsenen Bandscheibe anzutreffen. (Roberts et al., 2006).

Neben Kollagen Typ I sind im äußeren Bereich des Annulus fibrosus in kleinen Mengen auch Kollagen Typ III, V, VI, IX und X vorhanden. Die extrazelluläre Matrix des inneren Annulus besteht zu großen Teilen aus Kollagen Typ II, Proteoglykanen und Wasser (Wei et al., 2014).



**Abbildung 2. Aufbau der humanen Bandscheibe.** Die humane Bandscheibe unterteilt sich in einen innerliegenden gallertartigen Kern (Nucleus pulposus) sowie in den äußeren Faserring (Annulus fibrosus). Abbildung Prometheus LernAtlas – Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem (Thieme) mit Erlaubnis.

### Der Nucleus pulposus

Der Nucleus pulposus stellt den zentralen Anteil der Bandscheibe dar. Die gallertartige, isotrope extrazelluläre Matrix bildet den Hauptteil des Nucleus (Jongeneelen, 2006). Das Netzwerk aus willkürlich angeordneten Kollagenfasern (hauptsächlich Kollagen Typ II (Heyde, 2006)) steht in Verbindung mit dem inneren Anteil des Annulus fibrosus, sowie mit der

Deckplatte (Jongeneelen, 2006). Eingebettet in das Kollagen-Netzwerk sind Proteoglykane mit negativ geladenen Glykosaminoglykan-Seitenketten, welche auf Grund ihrer Polyanionenstruktur eine hohe Affinität zu Wasser besitzen (Heyde, 2006). Der Wasseranteil im Nucleus einer gesunden Bandscheibe kann zwischen 80 und 88% betragen (Wei et al., 2014). Durch Druckbelastungen beim Stehen und Sitzen kommt es im Laufe des Tages zum Auspressen des Wassers durch den Annulus fibrosus nach außen. Dies führt zu einer Abnahme der Bandscheibenhöhe um bis zu 1mm pro Bandscheibe, welche in den nächtlichen Ruhephasen durch Einstrom von Extrazellulärflüssigkeit wieder ausgeglichen wird. Durch De- und Rehydrierung in wechselnden Be- und Entlastungsphasen kann das bradytrophe Gewebe der Bandscheibe durch Diffusion ausreichend ernährt werden (G. Aumüller, 2006).

### **1.1.3 Die extrazelluläre Matrix**

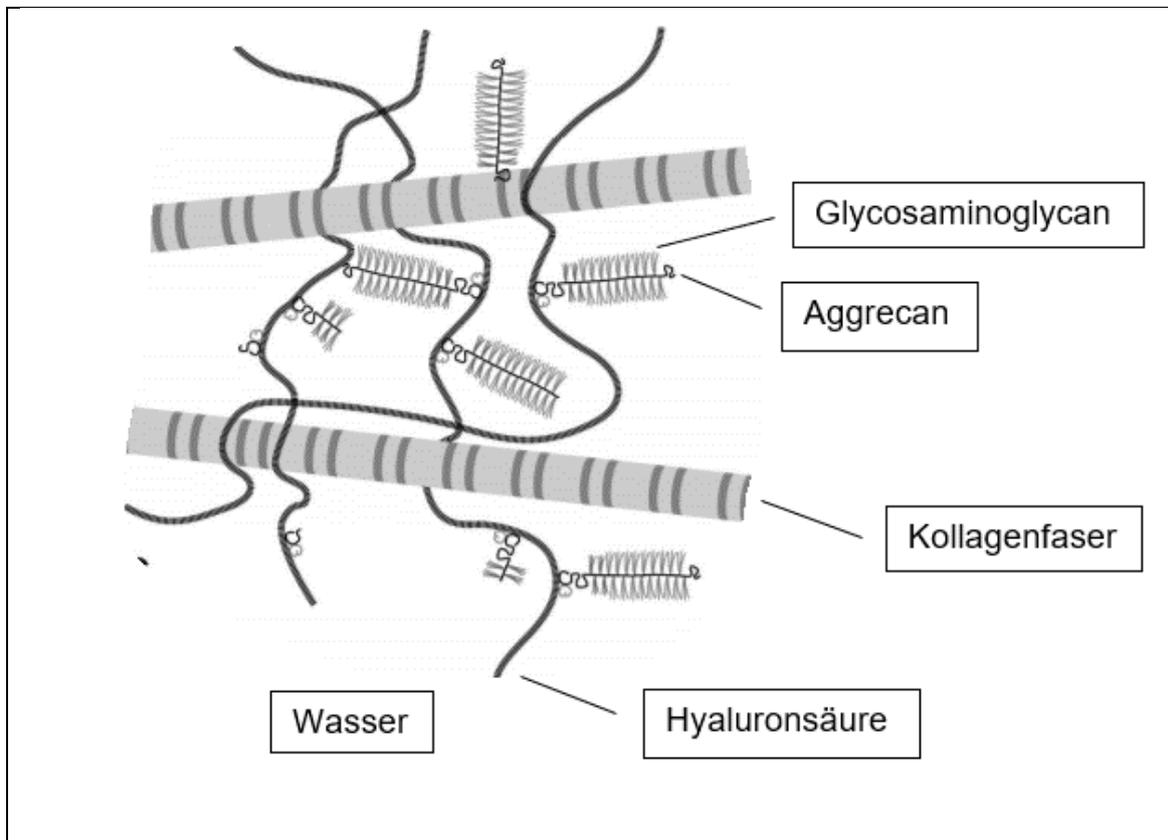
Die extrazelluläre Matrix (ECM) ist zusammen mit der interstitiellen Flüssigkeit das Füllungsmaterial zwischen den Zellen (Lüllmann-Rauch, 2009) und macht bei der humanen Bandscheibe den Hauptanteil aus. Eingebettet in die, zu großen Teilen aus Kollagenen, Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen bestehende Extrazellulärmatrix, liegen die Zellen der Bandscheibe. Ihr Anteil beträgt ca. 1% am Gesamtvolumen (Roberts et al., 2006). Ein weiterer Bestandteil der Extrazellulärmatrix sind Glykoproteine (Fibronectin).

Im Sinne eines stetigen „turn over“ unterliegt die extrazelluläre Matrix einer Kontrolle durch die lokalen Zellen, sowie durch Mediatoren, wie Zytokine oder Wachstumsfaktoren und wird durch diese fortwährend produziert und remodelliert (Heyde, 2006). Die wichtigsten Stimulanzen sind mechanischer Stress, die Nährstoffversorgung, sowie die osmotische und ionische Umgebung der Zellen (Jongeneelen, 2006).

Das Trockengewicht der Proteoglykane beträgt im Nucleus pulposus ca. 65% (im Annulus fibrosus ca. 20%) (Heyde, 2006) und bildet somit den Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix des gallertartigen, zentralen Anteils der Bandscheibe. Im Speziellen findet sich hier das zu den Hyalektanen (Löffler

and Petrides, 2003) zählende Aggrecan (Wei et al., 2014). Proteoglykane sind Proteine mit Kohlenhydratseitenketten, so genannte Glykosaminoglykane (GAG) (Rassow et al., 2008). Das in der Bandscheibe vorherrschende Aggrecan besitzt in etwa 30 Keratansulfat- und ungefähr 100 Chondroitinsulfat-Seitenketten (Löffler and Petrides, 2003). Das ca. 3000 kDa große Protein liegt im Körper nicht isoliert vor, sondern bildet Aggregate mit Hyaluronsäure. Diese stellt den langgestreckten zentralen Anteil des Komplexes dar (Rassow et al., 2008). Über ein kleines Verbindungsprotein (Link-Protein) können sich in regelmäßigen Abständen (Löffler and Petrides, 2003) bis zu 100 Aggrecanmoleküle anlagern (Rassow et al., 2008). Glykosaminoglykane tragen durch die Vielzahl an negativen Ladungen wesentlich zu der reversiblen Bindung von Molekülen bei (Rassow et al., 2008). Das große Bindungsvermögen von Wassermolekülen im Nucleus pulposus wird durch das Vorhandensein der sulfatierten Seitenketten der Glykosaminoglykane erreicht (Abbildung 3). Neben Proteoglykanen finden sich im Nucleus scheinbar willkürlich angeordnete Kollagenfasern (Kollagen Typ II) und elastischen Fasern (Richardson et al., 2007), sowie der chondrogene Transkriptionsfaktor SOX9 (Wei et al., 2014). Kollagen Typ II wirkt hauptsächlich den durch Quellungsdruck entstehenden Belastungen entgegen, wohingegen das im Annulus fibrosus vorherrschende Kollagen Typ I besonders effektiv Scherkräfte abfängt (Heyde, 2006). Der Anteil der Kollagene am Trockengewicht liegt im Annulus fibrosus bei 70%, im Nucleus pulposus bei 20% (Heyde, 2006). Etwa 80% der in der Bandscheibe vorkommenden Kollagene gehören zu der Gruppe der fibrillären Kollagene (Kollagen Typ I und II) (Roberts et al., 1991). Neben Kollagen Typ I und II enthält die extrazelluläre Matrix des Annulus fibrosus Kollagen Typ III, V, VI, IX und XI, der Nucleus pulposus Kollagen Typ VI, IX und XI (Jongeneelen, 2006). Deren exakte Aufgaben wurden teilweise noch nicht ausreichend untersucht (Richardson et al., 2007). Kollagenfasern sind zugfest. Unter Zugbelastung findet nur eine geringfügige Streckung statt, die sich aus der Streckung und der parallelen Ausrichtung gewellter und gekreuzter Fasern ergibt (G. Aumüller, 2006). Kollagene Fasern sind ca. 2-20µm dick und bestehen aus parallel angeordneten Kollagenfibrillen (15-130nm) (Lüllmann-

Rauch, 2009), die wiederum aus Mikrofibrillen zusammen gesetzt sind. Die Dicke einer Mikrofibrille variiert und ist abhängig von der Anzahl der Tropokollagene (G. Aumüller, 2006).



**Abbildung 3. Aufbau der extrazellulären Matrix.** Die Grafik zeigt die schematische Anordnung der extrazellulären Matrix und ihrer Bestandteile. **Modifizierter Teil der Abbildung A aus** „Osteoarthritis in the human knee: a dynamic process of cartilage matrix degradation, synthesis and reorganization. in *Joint Destruction in Arthritis and Osteoarthritis*“ (Poole et al., 1993) gefunden auf [www.tecomedical.com](http://www.tecomedical.com) mit Erlaubnis.

Die extrazelluläre Matrix kann in verschiedene Zonen eingeteilt werden, die möglicherweise ein Abbild der dort auftretenden Kollagentypen darstellen. Die interterritoriale Matrix beschreibt den Raum zwischen den Zellen und besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ I und II. Die territoriale Matrix befindet sich in direkter Nachbarschaft zur perizellulären Kapsel der Chondrone. Hier tritt vorwiegend Kollagen Typ III auf. Die Zellen sind von einer so genannten perizellulären Matrix (PCM) umgeben, die sich innerhalb der perizellulären Kapsel befindet und aus Kollagen Typ III und/oder Kollagen Typ VI besteht. Die

perizelluläre Kapsel besteht im Normalfall aus Kollagen Typ VI, manchmal aus Kollagen Typ III. Als Chondron wird die Einheit aus der Zelle, der sie umgebenden perizellulären Matrix und ihrer Kapsel bezeichnet (Roberts et al., 1991).

Die perizelluläre Matrix der humanen Bandscheibe beschreibt den Raum zwischen der Zelle und ihrer Kapsel und besteht aus einem dünnen Netzwerk aus Kollagen-VI-Fibrillen (Roberts et al., 1991), (Wilusz et al., 2014). Sie unterscheidet sich sowohl biochemisch, als auch biomechanisch von der Extrazellulärmatrix. Diese Unterschiede verleihen der PCM die Fähigkeit den einwirkenden Stress auf die mikromechanische Umgebung jedes einzelnen Chondrozyten innerhalb des Gewebes zu beeinflussen und umzuwandeln (Wilusz et al., 2014). Durch die perizelluläre Matrix wird vermutlich eine Verbindung zwischen Chondrozyt und territorialer Matrix hergestellt (Lüllmann-Rauch, 2009).

Auf Grund der Gefäßarmut in adultem Bandscheibengewebe scheint die unmittelbare perizelluläre Umgebung, in Bezug auf die Regulation der Zellaktivität, eine bedeutende Rolle zu spielen (Wilusz et al., 2014).

#### **1.1.4 Zellen in der humanen Bandscheibe**

Eingebettet in die Extrazellulärmatrix der humanen Bandscheibe liegen die zwei phänotypisch unterschiedlichen Zelltypen. Ihr Anteil am Gesamtvolumen beträgt in etwa 1% (Roberts et al., 2006). Hierbei nimmt die Zellanzahl von den Endplatten zum Nucleus pulposus und vom Annulus fibrosus zum Nucleus pulposus hin ab. (Heyde, 2006).

Die Zellen im Bereich des Annulus fibrosus sind schmal, langgestreckt und ähneln in ihrer Erscheinung den Fibroblasten. Sie liegen mit einer Zelldichte von 9000 Zellen/mm<sup>3</sup> entlang der Hauptfaserrichtung der Kollagenfasern (Richardson et al., 2007). Der hohe Anteil an Kollagen Typ I und II in der extrazellulären Matrix des Annulus fibrosus wird durch die fibroblastenartigen Chondrozyten synthetisiert (Chelberg et al., 1994).

Die den Knorpelzellen phänotypisch ähnelnden Chondrozyten (Richardson et al., 2007) im Nucleus pulposus produzieren hauptsächlich Kollagen Typ II (Chelberg et al., 1994). Die rundlichen Zellen liegen mit einer Zelldichte von 5000 Zellen/mm<sup>3</sup> zwischen den locker angeordneten Kollagenfasern (Richardson et al., 2007).

Die Nucleuszellen entstammen der, in der frühen Embryonalphase aus dem Endoderm entstehenden, Chorda dorsalis (Roberts et al., 2006). Die Zellanzahl nimmt nach der Geburt rasch ab. Dies konnte in eine Studie mit humanem fetalem (ab 8 Wochen postnatal) und puerilem Bandscheibengewebe (1-10 Jahre) gezeigt werden. Sechs Wochen nach der Geburt waren 2000 Zellen/mm<sup>2</sup> im Nucleus pulposus nachweisbar. Im Verlauf des ersten Lebensjahres sank die Zellzahl exponentiell auf 100 Zellen/mm<sup>2</sup>. Nach Abschluss des vierten Lebensjahres waren keine Restzellen der fetalen Chorda nachweisbar. Die Zellen werden durch chondrozytenartige Zellen ersetzt (Pazzaglia et al., 1989), deren Herkunft unklar ist. Die adulten Nucleuszellen gehen vermutlich aus den embryonalen notochordalen Strukturen hervor. Des Weiteren wurden in humanem degeneriertem Bandscheibengewebe multipotente Vorläuferzellen gefunden, deren Herkunft und Funktion bisher nicht eindeutig geklärt sind (Navone et al., 2017).

Die verschiedenen Zelltypen der Bandscheibe unterscheiden sich auch in ihren mechanischen Eigenschaften. Dies ist in der unterschiedlichen Bauweise des Zytoskeletts begründet. Die Gesamtmenge, sowie die Verteilung des Moleküls Aktin hat hierbei den größten Einfluss. Die Zellen des Nucleus pulposus, sowie die Zellen in der Übergangszone haben eine höhere Syntheseleistung an Kollagenen und Proteoglykanen, verglichen mit Zellen des Annulus fibrosus. Des Weiteren weisen sie eine signifikant höhere Viskosität und eine höhere Steifigkeit auf (Heyde, 2006).

## 1.2 Biomechanik

Die Wirbelsäule dient der Übertragung des Gewichtes von Kopf, Hals, oberen Extremitäten und der über dem Beckengürtel liegenden Teil des Rumpfes, auf die Beine. (G. Aumüller, 2006).

Bei den Bandscheiben handelt es sich unter anatomischen Gesichtspunkten um eine Symphyse (Heyde, 2006), also um eine Verwachsung zweier Knochen mit dazwischenliegendem Faserknorpel (G. Aumüller, 2006). Die Funktionen betreffend gliedert sich die Wirbelsäule in Bewegungssegmente. Hierzu zählen neben den beiden benachbarten Zwischenwirbelscheiben das Wirbelbogengelenk und die sie verbindenden ligamentären und muskulären Strukturen. Klinisch werden der Inhalt des Wirbelkanals und der Zwischenwirbellöcher zum Bewegungssegment nach Junghanns hinzugezählt. (G. Aumüller, 2006).

Eine gesunde Bandscheibe stellt eine stabile viskoelastische Einheit dar, die unempfindlich gegenüber Zug- und Scherkräften, sowie gegenüber axialen Belastungen ist. Des Weiteren sichert dieser Aufbau die Mobilität der Wirbelsäule, sowie die Widerstandsfähigkeit gegenüber vertikalen Krafteinwirkungen (Heyde, 2006). Die Kompensation der Druckbelastungen erfolgt durch die Anteile des Nucleus pulposus, der durch seine Wasserbindungsfähigkeit in der Lage ist axiale Belastungen gleichmäßig zu verteilen und in Zugkräfte des den Nucleus umschließenden Annulus umzuwandeln. Zug-, Scher- und Rotationskräfte werden durch die im Annulus fibrosus entgegengesetzt angeordneten Kollagenfasern ausgeglichen (Heyde, 2006). Die bei einer Degeneration vorliegende Verminderung der Wasserbindungsfähigkeit sowie eine beginnende Fissurbildung im Annulus fibrosus (Heyde, 2006) führen zu einem Verlust dieser Eigenschaften (Heyde, 2006).

### 1.3 Alterungsprozesse und Degeneration

Alle Strukturen, die am Aufbau der Wirbelsäule beteiligt sind durchlaufen einen physiologischen Verschleißprozess. Hierzu zählen neben den Bandscheiben und Wirbelkörpern die Wirbelgelenke, die Muskulatur und die Bänder (Niethard and Pfeil, 2005). Die physiologisch bedingten Altersveränderungen sind vor allem durch eine Dehydratation bedingt (Heyde, 2006), die aus einer Abnahme der Wasserbindungsfähigkeit des Nucleus pulposus resultiert (Niethard and Pfeil, 2005), wodurch wiederum die biomechanischen Eigenschaften herabgesetzt werden, was eine weitere Schädigung unter Belastung begünstigt. Bei einer somit zunehmend schneller erreichten Diskrepanz zwischen Belastung und Belastbarkeit, ggf. verstärkt durch reduzierte muskuläre Führung beispielsweise im Rahmen von Erkrankungen des Stütz- und Bewegungsapparates oder in Folge von Verletzungen oder durch systemische Erkrankungen kann die Bandscheibe über das altersentsprechende Maß hinaus degenerieren.

Bereits nach der Geburt sind erste Veränderungen wahrnehmbar. Die Gefäßkanälchen der kartilaginären Endplatte füllen sich mit extrazellulärer Matrix, die Blutgefäße im Bereich des Annulus fibrosus bilden sich zurück. Bereits im Alter von zwei Jahren sind degenerative Veränderungen mikroskopisch sichtbar: Zerfall und/oder Proliferation von Nucleuszellen, harmlose Spaltenbildung, Veränderungen der Zelldichte und eine Degeneration der Matrix der kartilaginären Endplatte (Roberts et al., 2006).

Auf zellulärer Ebene kann mit zunehmendem Alter eine Zunahme der Zellproliferation beobachtet werden mit teilweise Cluster-Bildung (Zellanhäufungen) und auch erhöhtem Zelltod (vermutlich durch Apoptose, sowie durch Nekrose) (Roberts et al., 2006). Die durch die Zellalterung bedingte herabgesetzte Transkriptionsleistung und Synthesekapazität der Bandscheibenzellen führen zu Veränderungen in der Zusammensetzung und Konzentration der extrazellulären Matrix (Heyde, 2006), was wiederum die Suszeptibilität gegenüber schädigenden Faktoren erhöht.

Nach Antoniou et al. lassen sich drei Phasen des Matrix-turn-over in Abhängigkeit des Alters und des Degenerationsgrades unterscheiden: Aggrecan, Prokollagen I und II werden in Phase I, der Wachstumsphase (0-15 Jahre), vermehrt synthetisiert, während Kollagen Typ II, im Alter von 2-15 Jahren, vermehrt denaturiert wird. In der Reifungs- und Alterungsphase (15-40 Jahren) findet eine Reduktion der Kollagen-Typ-II-Denaturierung statt. Abgesehen von Prokollagen I vermindert sich die Neubildung von Matrixmolekülen. Die degenerative oder fibrotische Phase (Phase III) findet im Alter von 40-80 Jahren statt. Sie ist gekennzeichnet durch einen leichten Anstieg der Prokollagen-Typ-I-Synthese. Prokollagen Typ II und Aggrecan werden nicht vermehrt gebildet (Antoniou et al., 1996).

Das verringerte Volumen des Nucleus, bedingt durch den verminderten Wassergehalt, sowie die durch die Degeneration hervorgerufene Verdickung der Kollagenfasern des Annulus fibrosus führen zu einer Veränderung der biomechanischen Eigenschaften der Bandscheibe. Der hydrostatische Druck im Nucleus pulposus einer gesunden Bandscheibe wirkt axial physiologischerweise einwirkenden Kräften entgegen und die umschließenden Kollagen I Fasern fangen diesen Druck im Sinne von Zugkräften auf, wofür diese letztendlich auch ausgerichtet sind. Diese axialen Stoßkräfte werden nun vermehrt direkt von den Fasern des Annulus fibrosus aufgefangen und bedingen eine weitere Überbelastung dieser Strukturen (Heyde, 2006).

Die regelrechte Anordnung der Strukturen des makromolekularen Netzwerkes der extrazellulären Matrix, sowie deren Wassergehalt sind für die Versorgung der Zellen und für den Abtransport der anfallenden Stoffwechselprodukte unentbehrlich. Wechselnde Be- und Entlastungsphasen sorgen in der gesunden Bandscheibe für einen ausreichenden Austausch von Wasser und Nährstoffen (Heyde, 2006). Auf Grund der verschlechterten Stoffwechselsituation in degeneriertem Bandscheibengewebe, sind eine verringerte Sauerstoffkonzentration, ein absinkender pH-Wert, sowie eine Erhöhung der Laktatkonzentration zu beobachten (Heyde, 2006).

Charakteristische Merkmale einer Degeneration sind Dehydratation, Fissurbildung im Bereich des Annulus fibrosus (Chondrosis intervertebralis (Niethard and Pfeil, 2005)), Austritt von Nucleusgewebe durch diese Fissuren und durch Veränderungen im Bereich der Grund- und Deckplatten (Diskushernie (Niethard and Pfeil, 2005)). Der daraus resultierende Höhenverlust bedingt eine Störung im gesamten Bewegungssegment nach Junghanns (Heyde, 2006) und ermöglicht eine pathologisch erhöhte Beweglichkeit mit konsekutiver Instabilität des Bewegungssegmentes und vermehrter Belastung der Grund- und Deckplatten. Bei einem Bandscheibenvorfall wird zwischen einer Protrusion (Verlagerung) und einem Prolaps (Vorfall) unterschieden. Ein hervortretender, jedoch intakter Faserring in den Zwischenwirbelkanal wird als Protrusion bezeichnet. Bei Heraustreten von Bandscheibengewebe durch einen Riss im Annulus fibrosus liegt ein Prolaps vor. Freiliegende Bandscheibenanteile (Sequester) stellen im Spinalkanal Raumforderungen dar und sind mit intraspinalen Geschwulsten zu vergleichen. Hauptverantwortlich für die Entstehung eines Bandscheibenvorfalles ist neben der entstehenden Druckbelastung der Wirbelsäule auch die Beweglichkeit des betroffenen Wirbelsäulenabschnitts. Die Brustwirbelsäule ist in ihrer Beweglichkeit auf Grund der Stabilisierung durch die Rippen eingeschränkt. Hier kommen Bandscheibenvorfälle sehr selten vor (Liehn et al., 2016).

Die röntgenologisch sichtbare Strukturveränderung im Sinne einer Sklerosierung wird als Osteochondrose bezeichnet (Niethard and Pfeil, 2005). Am Wirbelkörpertrand kann es im Sinne einer Abstützreaktion zur Knochenneubildung (Spondylose), mit röntgenologisch imponierenden Randzacken (Spondylophyten) kommen. Diese degenerativen Prozesse führen bei Einengung des Spinalkanals und der Foramina intervertebralia zum Krankheitsbild der Spinalkanalstenose (Niethard and Pfeil, 2005).

## 1.4 Entzündungsreaktion und Immunantwort

### 1.4.1 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem ist Teil der angeborenen körpereigenen Immunabwehr. Es dient der Abwehr eindringender Pathogene unter Vermittlung und Auslösung inflammatorischer Prozesse (Heyde, 2006). Die kaskadenartige Aktivierung mehrerer Plasmaproteine führt zur Aktivierung von Leukozyten und Endothelzellen, zur Freisetzung anaphylaktisch wirkender Faktoren (C3a, C4a, C5a), sowie zur Aktivierung der Phagozytose (Heyde, 2006) (Schmidt et al., 2010).

Der klassische Weg der Komplementaktivierung erfolgt über die Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen mit folgender Aktivierung des Komplementfaktors C1. Hierzu ist der Kontakt des Immunsystems mit dem Krankheitserreger erforderlich, was zur Bildung der Antikörper gegen die entsprechenden Antigene führt. Der alternative Weg der Komplementaktivierung wird durch Aktivierung des Komplementfaktors C3 zu C3b auf Grund mikrobieller Oberflächenpolysaccharide eingeleitet (Schmidt et al., 2010). Das Endprodukt der Komplementkaskade, der C5-9-Komplex (Membranangriffskomplex) führt, über die Ausbildung von Ionenkanälen, schließlich zur Destruktion der Zellmembran und zur Lyse im Bereich des entzündlich veränderten Gewebes (Grönblad et al., 2003).

Dieser Membranangriffskomplex (MAC) konnte im Jahre 2003 durch Grönblad et al. in degeneriertem Bandscheibengewebe und in Gewebe aus Bandscheibenvorfällen nachgewiesen werden. Bei degeneriertem Bandscheibengewebe wurde eine deutlich höhere Konzentration des MAC in den Anteilen des Annulus fibrosus festgestellt (Grönblad et al., 2003). In Gewebeproben aus Bandscheibenvorfällen hingegen war die Konzentration im Nucleus pulposus, vor allem bei Sequesterbildung, stark erhöht. In keinem Fall konnte der MAC in gesunden Gewebeproben nachgewiesen werden (Grönblad et al., 2003).

Es gibt keinen Beweis für das Bestehen eines mikrobiellen Milieus im Zusammenhang mit degenerativen Bandscheibenerkrankungen oder

Bandscheibenvorfällen. Ein indirekter Beweis für die Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen Weg liegt hingegen vor (Grönblad et al., 2003).

Eine Studie aus dem Jahr 2016 lässt auf eine Beteiligung von IL-9 bei der Entstehung von degenerativen Bandscheibenerkrankungen schließen. Es wird vermutet, dass IL-9 eine bedeutende Rolle bei autoimmunen Entzündungsprozessen einnimmt und somit degenerative Erkrankungen der Bandscheibe Teil dieser Prozesse sind (Zhang et al., 2016b).

#### **1.4.2 Apoptose**

Apoptose ist eine Form des physiologischen programmierten Zelltods ohne Entzündungszeichen und lokale Gewebeschädigung. In diesen Punkten unterscheidet sich die Apoptose wesentlich von der Nekrose (Heyde, 2006). Über diesen Mechanismus des suizidalen Zelltodes (Schmidt et al., 2010) können die Zellzahl reguliert und an die funktionellen Anforderungen angepasst, sowie die Gewebemöostase aufrecht erhalten werden (Heyde, 2006). Durch Apoptose können Zellen mit unkontrolliertem Wachstum, Beschädigungen oder intrazellulären Infektionen entfernt werden (Schmidt et al., 2010).

Die Apoptose auslösenden Stimuli können über Rezeptoren (CD95 oder Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor), physikalisch (ionisierende Strahlung, UV-Licht, Hitze) oder chemisch (Zytostatika) vermittelt werden (Schmidt et al., 2010). Bei der Aktivierung des programmierten Zelltods werden zwei Hauptwege unterschieden. Der intrinsische oder mitochondrial vermittelte Aktivierungsweg erfolgt über Apoptoseaktivatoren, wie beispielsweise das Tumorsuppressorprotein P53. Bei Schädigungen der DNA wird dieses normalerweise instabile Protein posttranslational stabilisiert und akkumuliert dadurch in der Zelle, was bei Ausbleiben entsprechender DNA-Reparatur dann den Apoptoseprozess einleiten kann. Der extrinsische rezeptorvermittelte Weg erfolgt mittels der Bindung eines Liganden an einen TNF-Rezeptor, der daraufhin durch Aktivierung intrazellulärer Proteine die Apoptose auslöst (Heyde, 2006).

Das Vorliegen apoptotischer Zellen lässt sich morphologisch auf Grund eines verminderten Zellvolumens, Ausstülpungen an der Zellmembran, Verdichtung des Chromatins und an Hand des fragmentierten Zellkerns, sowie seiner DNA erkennen (Zhang et al., 2016a). Das Ausbleiben einer lokalen Entzündungsreaktion liegt im vesikulären Abtransport der Zellfragmente begründet (Heyde, 2006).

Bei histochemischen Untersuchungen von Bandscheibengewebe mittels der TUNEL-Methode (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling), zeigten sich in mehreren Studien, vermehrt TUNEL-positive Zellen als Ausdruck einer verstärkten Apoptose in degenerativ verändertem Gewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Zhang et al., 2016a). Auf Grund der Herabsetzung der Zellanzahl und die Einflussnahme auf die Gewebekomöostase spielt die Apoptose in der Degeneration des Bandscheibengewebes eine bedeutende Rolle (Heyde, 2006).

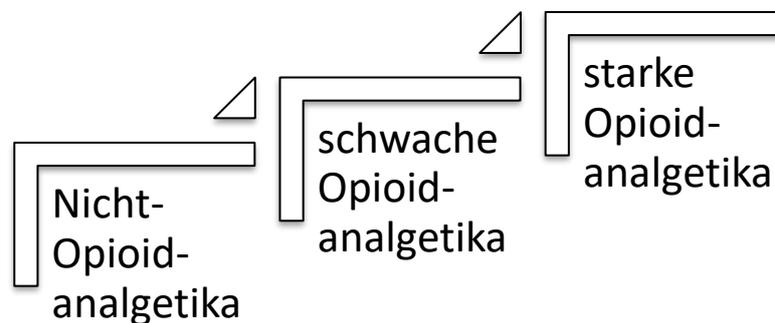
### **1.4.3 IL-1 $\beta$**

Interleukine stellen körpereigene Botenstoffe der Zellen des Immunsystems dar. Das zur Interleukin (IL)- Familie gehörende IL-1 $\beta$  kann in gesunden Zellen nicht nachgewiesen werden (Dinarello et al., 2012) . Das Peptidhormon fungiert als proinflammatorischer Entzündungsmediator, welcher eine vermehrte Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen und MMPs bedingt. Die freigesetzten Mediatoren tragen wesentlich zur Degeneration der extrazellulären Matrix bei (Heyde, 2006). Die Hemmung von IL-1 $\beta$  fördert im Umkehrschluss die Wiederherstellung der extrazellulären Matrix und hemmt die Degeneration des Bandscheibengewebes. (Fang and Jiang, 2016). IL-1 $\beta$  kann sowohl von den ortsansässigen Bandscheibenzellen produziert werden, als auch von eingewanderten Immunzellen (Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen) und wird vermehrt in Gewebeabschnitten des Nucleus pulposus (im Vergleich zu Gewebe des Annulus fibrosus), sowie häufiger bei symptomatischen (beispielsweise schmerzhaften), im Vergleich zu asymptomatischen degenerativen Erkrankungen vorgefunden (Navone et al., 2017).

#### 1.4.4 Symptomatische Therapie

Erkrankungen im Bereich der Lendenwirbelsäule, die mit lokalen Schmerzen oder Schmerzausstrahlung in pseudoradikuläre Bereiche einhergehen, können unter dem Begriff Lumbalsyndrom zusammengefasst werden. Die konservative Therapie umfasst hierbei die Schmerztherapie nach dem WHO-Stufenschema, Krankengymnastik oder manuelle Therapie (Ruchholtz and Wirtz, 2013).

Die symptomatische Therapie bei Bandscheibenvorfällen in den lumbalen und zervikalen Abschnitten der Wirbelsäule beinhaltet die Schmerztherapie nach dem WHO-Stufenschema, die Stufenbettlagerung, Krankengymnastik und physikalische Therapie, sowie die Infiltrationsbehandlung (Ruchholtz and Wirtz, 2013). 80-90% der Bandscheibenvorfälle sprechen auf eine konservative Therapie gut an (Ruchholtz and Wirtz, 2013).



**Abbildung 4. WHO-Stufenschema.** Das Schaubild zeigt die laut Weltgesundheitsorganisation empfohlenen Richtlinien zur Verabreichungshierarchie von Schmerzmitteln.

Das 1986 veröffentlichte Stufenschema der Weltgesundheitsorganisation basiert auf den, durch ein multidisziplinär besetztes Expertengremium in Mailand, erarbeiteten Richtlinien, zur Behandlung von Krebschmerzen. Dieses sieht vor, Schmerzen zunächst mit Nicht-Opioidanalgetika zu therapieren (Beubler, 2012). Hierzu zählen unter anderem Acetaminophen (Paracetamol), Dipyron (Metamizol), Arylpropionsäuren (Ibuprofen), Acetylsalicylsäure (ASS)

und Arylessigsäure (Diclofenac) (Beubler, 2016). Bei ausbleibendem Therapieerfolg können schwache, gefolgt von starken Opioiden eingesetzt werden. Hierbei darf bei persistierender Schmerzsymptomatik nicht auf Medikamente derselben Stufe ausgewichen werden oder eine Dosiserhöhung erfolgen (Abbildung 4). Der Einsatz von Adjuvantien, also Hilfsstoffe ohne direkt analgetische Wirkung, die jedoch die Wirkung des Schmerzmittels verstärken können, ist denkbar. Laut WHO empfohlene Adjuvantien können beispielsweise Antikonvulsiva (Carbamazepin), Neuroleptika (Haloperidol), Anxiolytika (Diazepam) oder Glucocorticoide (Prednisolon, Dexamethason) sein (Beubler, 2012).

In der Praxis sieht die Anwendung der Stufenleiter vor, dass Medikamente, wenn möglich oral („by the mouth“) und regelmäßig („by the clock“) verabreicht werden, sodass zwischen den Einnahmezeiten keine Schmerzen entstehen. Des Weiteren soll die Auswahl des verabreichten Arzneimittels in Abhängigkeit der Schmerzintensität erfolgen („by the ladder“) und als individuelle Therapie den Einsatz von Coanalgetika beinhalten („for the individual“). Die individuelle Abstimmung der Therapie auf den einzelnen Patienten berücksichtigt auch den Einsatz von nicht medikamentösen Therapieformen („attention to detail“) (Beubler, 2012).

Die Wirkungsweise aller oben genannten Nicht-Opioidanalgetika greift in die Arachidonsäurekaskade ein und beruht auf der Hemmung der im Körper allgegenwärtig vorkommenden Cyclooxygenase. Die Cyclooxygenase steht am Anfang der Prostaglandinsynthese und kann, mit Hilfe der Phospholipase A<sub>2</sub>, die aus der Zellmembran freigesetzten Arachidonsäuren in Prostanoidvorstufen umwandeln. Bei der Entstehung von Schmerz und Entzündung stellt Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) das bedeutendste proinflammatorische Prostaglandin dar. Es verfügt über die Fähigkeit die Gefäßpermeabilität und die Wirkungsintensität von Entzündungsmediatoren, wie Kininen und Histaminen zu erhöhen (Beubler, 2016).

Glucocorticoide besitzen lediglich eine indirekt analgetische Wirkung. Ihr Einsatz als Co-Analgetikum rechtfertigt sich vor allem durch ihre

antiphlogistische, aber auch durch ihre antiödematöse und psychostimulierende Wirkungsweise (Beubler, 2016). Sie stellen die stärksten verfügbaren entzündungshemmenden Wirkstoffe dar. Ihr Wirkprinzip beruht auf verschiedenen Mechanismen. Hierzu zählen unter anderem die Inaktivierung von Zytokinen (IL-1 oder TNF- $\alpha$ ), die Hemmung der Bildung von Prostaglandinen und die Hemmung von Phospholipase A<sub>2</sub> (Forth et al., 2017).

Die zur Therapie von rheumatoider Arthritis zugelassenen Biopharmazeutika, so genannte Biologicals, finden ihre Anwendung auch bei der Behandlung von bandscheibenbedingten Rückenschmerzen. Die biotechnologisch hergestellten Zytokininhibitoren stellen Immunsuppressiva dar und müssen parenteral verabreicht werden (Forth et al., 2017). Ein Eingreifen in die Pathogenese von chronisch-entzündlichen Erkrankungen ist über die Hemmung der T-Zellaktivierung, das Blockieren proinflammatorischer (Anti-TNF- $\alpha$ ) oder die Substitution antiinflammatorischer Zytokine (IL-1, IL-4, IL-10) möglich (Antoni and Manger, 2004). Eingesetzt werden hierbei beispielsweise Anti-TNF- $\alpha$ -Antikörper (Infliximab, Adalimumab), Interleukin-1-Rezeptor-Antagonisten (Anakinra) oder Interleukin-6-Rezeptor-Antagonisten (Tocilizumab) (Forth et al., 2017).

#### **1.4.5 Operative Verfahren**

Bei degenerativen Bandscheibenerkrankungen findet die operative Therapie bei konservativ therapieresistenten Beschwerden Anwendung. Gängigstes Verfahren ist hierbei die Spondylodese (Wirbelkörperverblockung), welche meist durch eine dorsale Fixatur in Kombination mit einem in das Bandscheibenfach eingebrachten Cage oder Knochenspan erfolgt. Hierbei unterscheidet man je nach Zugangsweg die PLIF-, TLIF- und OLIF-Technik (von dorsal, einseitig), die XLIF-Technik (lateral) und die ALIF-Technik (dorsal und ventral). Das Einbringen einer Bandscheibenprothese ist ebenfalls möglich. Diese Operationstechnik ist jedoch bei Spinalkanalstenosen, großen Bandscheibenvorfällen, Spondylarthrosen (degenerative Veränderungen der kleinen Wirbelkörper), Spondylolisthesen (Wirbelgleiten), Spondylolysen

(Spaltbildung in der Pars interarticularis eines Wirbelbogens) und Osteoporose kontraindiziert (Ruchholtz and Wirtz, 2013).

Der Goldstandard bei Bandscheibenvorfällen mit anhaltender Schmerzsymptomatik stellt die offene Nucleotomie in mikrochirurgischer Technik dar. Hierbei wird eine Bergung des Bandscheibenvorfalles selbst, sowie ggf. eine Reduktion des Bandscheibenvolumens angestrebt. Absolute OP-Indikationen sind akute Lähmungserscheinungen funktionell wichtiger Muskeln, progrediente Lähmung oder das Bestehen einer Cauda-Symptomatik. Die Operation ist relativ indiziert bei anhaltender starker Schmerzsymptomatik über 6 Wochen (Ruchholtz and Wirtz, 2013).

## **1.5 Zielsetzung der Arbeit**

Laut einer Telefonumfrage des Robert-Koch-Institutes von 2003-2006 leiden 74%-85% aller Menschen in Deutschland mindestens einmal in ihrem Leben an Rückenschmerzen (Raspe). Etwa 40% der Rückenschmerzen sind auf degenerative Bandscheibenerkrankungen zurückzuführen (Zhang et al., 2016b). Degenerative Veränderungen an Bandscheiben, Wirbelkörpern, Wirbelgelenken, sowie an Muskulatur und Bändern in diesem Bereich entstehen häufig altersbedingt und müssen keinen Krankheitswert besitzen (Niethard and Pfeil, 2005).

Bereits nach der Geburt entstehen erste Verschleißprozesse (Roberts et al., 1991). Mit zunehmendem Alter nimmt die Wasserbindungsfähigkeit des Nucleus pulposus ab (Niethard and Pfeil, 2005), die Konzentration und Zusammensetzung der extrazellulären Matrix verändert sich auf Grund der herabgesetzten Transkriptionsleistung und Synthesekapazität der Zellen (Heyde, 2006).

Die perizelluläre Matrix ist Bestandteil der extrazellulären Matrix und bildet mit den Zellen des Nucleus pulposus und Annulus fibrosus das Chondron (Roberts et al., 1991). Sie dient vermutlich der Umwandlung der biochemischen und biomechanischen Signale der Chondrozyten. Die degenerativen

Veränderungen des makromolekularen Netzwerkes bedingen eine unzureichende Nährstoff- und Wasserversorgung (Heyde, 2006).

Die therapeutischen Maßnahmen reichen von Physiotherapie, über medikamentöse Therapieansätze bis zu operativen Behandlungsmethoden.

Ziel dieser Dissertation war es zunächst die Zellularität von Bandscheibenzellen, aus unterschiedlich stark degeneriertem Bandscheibengewebe, darzustellen. Hierbei galt es zusätzlich die Frage zu klären, welche Bedeutung die perizelluläre Matrix auf die Zellularität der Zellen hat.

Das Hauptziel dieser Arbeit war es, die Auswirkung von antiphlogistischen Therapeutika, wie sie tagtäglich bei Rückenschmerzen zum Einsatz kommen, auf die Zellularität von Chondrozyten zu untersuchen. Hierfür wurden Zellen aus degeneriertem Bandscheibengewebe während ihrer Wachstumsphase zusätzlich mit entzündungsmodulierenden Medikamenten versorgt.

Die Zellularität wird im Folgenden durch die Ermittlung des Zellgehaltes der angelegten Zellkulturen bestimmt und beschreibt somit das Wachstum der Zellkulturen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

**Tabelle 1. Übersicht der verwendeten Chemikalien**

Alginate sodium salt 2% (Kat. Nr. A7003-1kg)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Calciumchlorid $\text{CaCl}_2$ (147,02 g/mol) (Kat.Nr. CN93.2)	Carl Roth GmbH&Co.KG
Citronensäure $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ (192,13 g/mol) (Kat. Nr. 1037621000)	Merck KGaA

D(+)-Trehalose Dihydrat 378,24 g/mol (Kat. Nr. 5151.1)	Carl Roth GmbH&Co.KG
EDTA C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> (292,25 g/mol) (Kat. Nr. CN06.3)	Carl Roth GmbH&Co.KG
Hepes (238,31 g/mol) (Kat.Nr. 11344-025)	Life Technologies GmbH
Natriumchlorid NaCl (58,44 g/mol) (Kat. Nr. 1064041000)	Merck KGaA

### 2.1.2 Zellkulturmedium und Puffer

Tabelle 2. Übersicht der verwendeten Zellkulturmedien und Puffer

DMEM/F-12, GlutaMAX™ Supplement 500 ml (Kat. Nr. 31331-028)	Life Technologies GmbH
DPBS, Dulbecco Phosphate Buffered Saline (Kat. Nr. 10010-015)	Life Technologies GmbH
FCS, Fetal Calb Serum (Art. Nr. S0615)	Biochrome GmbH
Penicillin Streptomycin (PenStrep) (Kat. Nr. 15140122)	Life Technologies GmbH
Trypan Blau 0,4% (Kat. Nr. 93595- 50ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

### 2.1.3 Enzyme und Proteine

Tabelle 3. Übersicht der verwendeten Enzyme und Proteine

Collagenase from Clostridium histolyticum (Kat. Nr. 9407-100UG)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
--	---------------------------

Dispase II (Kat. Nr. 4942078001)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Interleukin-1- $\beta$ human 10UG (Kat. Nr. SRP 3083)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

#### 2.1.4 Medikamente

**Tabelle 4. Übersicht der verwendeten Medikamente**

Wirkstoff	Handelsname	Hersteller
Adalimumab	Humira 40mg/0,8ml	AbbVie GmbH&Co.KG
Anakinra	Kineret 100mg/0,67ml Injektionslösung	Swedish Orphan Biovitrum GmbH
Diclofenac-Natrium	Diclac 75mg/3ml Injektionslösung	Hexal AG
Ibuprofen	Nurofen® Schmerz- und Fiebersaft 4% (NURFD0077)	Reckitt und Benckiser Deutschland GmbH
Paracetamol	Kabi Infusionslösung 10mg/ml	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
Prednisolon-21-hydrogensuccinat	Prednisolut 10mg/2ml	Mibe GmbH
Tocilizumab	RoActemra 20mg/ml	Hoffmann - La Roche AG

#### 2.1.5 Lösungen

**Tabelle 5. Übersicht der für die Zellkultur verwendeten Lösungen**

2.1.5.1 Zellkultur	
Alginate zur 3-D-Kultivierung der Bandscheibenzellen	1,25% Na-Alginate in 0,9% NaCl

CaCl <sub>2</sub> - Lösung zur Polymerisation der Alginatkugeln	CaCl <sub>2</sub> 102mM in 0,9% NaCl in aqua dest., 500 ml, autoklaviert
Citrat-Lösung zur Auflösung der Alginatkugeln	Citrat 55mM, EDTA 30mM, NaCl 0,15M, Hepes 10mM
Zellkulturmedium	DMEM + 10% FCS+ 1% Pen/Strep

### 2.1.6 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 6. Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien**

cell culture plate, sterile with lid 6-well, 96-well (Kat. Nr. 657160/657185)	Greiner Bio-One GmbH
Cell Strainer/ Esaystrainer 100µm (REF 542000)	Greiner Bio-One GmbH
CELLSTAR® Polypropylen Röhrrchen 15ml (Kat. Nr. 188271) 50ml (Kat. Nr. 210261)	Greiner Bio-One GmbH
Desinfektionsmittel Descosept AF (Kat. Nr. 00-311-100)	Dr. Schumacher GmbH
Eppendorf Tubes (0,5ml, 2ml) (Kat. Nr. 0030121.023/094)	Eppendorf AG
Falcon® Seriological Pipet 5ml (Kat. Nr. 357543) 10ml (Kat. Nr. 357551) 25ml (Kat. Nr. 357525)	Corning Incorporated Life Science
Feather disposable scalpel (Kat. Nr. 02.001.30.021)	Pfm medical ag
Handschuhe, Peha-soft® nitrile white, powderfree (Kat. Nr. 9422062)	PAUL HARTMANN AG
U-40 Insulin 1ml (REF 300026)	BD Deutschland
Super Frost Plus (03-0060)	R. Langenbrinck GmbH Labor&Medizintechnik

Neubauerzählkammer	Hecht Assistent ®
Petrischalen Standard H145mmx20mm (Kat. Nr. 639102)	Greiner Bio-One GmbH
Pinzetten	Aesculap AG
Schraubbecher 100ml, PP (Kat. Nr. 75.562.105)	Sarstedt AG &Co .KG
Sur Phob® Pipettenspitzen (10µl, 100µl, 1000µl) (Kat. Nr. VT0210/VT0240/VT0260)	Biozym Scientific GmbH

### 2.1.7 Geräte

**Tabelle 7. Übersicht der verwendeten Geräte**

Autoklave HV-50L	HMC Europe GmbH
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Binder GmbH
Eppendorf Research plus (10µl, 100µl, 1000µl) (Kat. Nr. 3120 000.020/054/062)	Eppendorf AG
Feinwaage (ABJ220_4M)	Kern&Sohn GmbH
Handzähler neoLab-Hand-Stückzähler 0-9999 (Bestell-Nr.: 880117509)	Köhler GmbH
Magnetrührer IKAMAG RET (4236)	IKA®-Werke GmbH&Co.KG
Mikroskop (Fluovert FS)	Leicar Microsysteme Vertrieb GmbH Mikroskopie und Histologie
pH-Meter (Five easy FE 20)	Mettler-Toledo GmbH
Pipettierhilfe Pipetboy "Pipetus" (Kat. Nr. 9907200)	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG
Rüttelplatte IKA Vibrax-VXR	IKA®-Werke GmbH&Co.KG
Sterilbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH
Wasserbad W12	Labortechnik Medingen
Zentrifuge (Centrifuge 5424 R)	Eppendorf AG

### 2.1.8 Software

**Tabelle 8. Übersicht der verwendeten Software**

Microsoft Word	Microsoft Corporation
EndNote	Clarivate Analytics
SPSS	IBM Deutschland

### 2.1.9 Humanes Bandscheibengewebe

Die Entnahme des Bandscheibengewebes erfolgte bei der operativen Versorgung von Patienten mit Bandscheibenvorfällen und fortgeschrittenen degenerativen Erkrankungen der Wirbelsäule. Die Entnahme war nicht studienbedingt und erfolgte routinemäßig im Rahmen der operativen Versorgung an der Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen (Hoppe-Seyler-Straße 3, 72076 Tübingen). Die Aufklärung der Patienten erfolgte mündlich und schriftlich, durch ärztliches Personal, spätestens einen Tag vor der Operation (Aufklärungsbogen im Anhang). Ein positives Votum der Tübinger Ethikkommission der medizinischen Fakultät lag vor (Projektnummer: 244/2013BO2).

Die entnommenen Bandscheiben wurden in einem sterilen Gefäß mit Schraubverschluss in 50ml DMEM + 1% PenStrep (Penicillin 10,000U/ml; Streptomycin 10,000µg/ml), bis zur Abholung am selbigen Tag, bei 4°C gelagert. Die Isolation der Chondrone und Chondrozyten erfolgte am Operationstag.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Isolierung der humanen Chondrone und Chondrozyten

Vorbereitung der Gewebeproben:

Nach Abholung der Gewebeproben wurden diese in einer Petrischale unter der Sterilbank genauer betrachtet. Die Einteilung in drei Klassen erfolgte durch haptische und optische Beurteilung der Gewebeproben.

**Tabelle 9. Einteilungskriterien der Gewebeproben**

<b>Klassen</b>	<b>Optische und haptische Kriterien</b>
Klasse I	Am Stück, elastisch, überdurchschnittlich gut
Klasse II	Weniger elastisch, aufgefasert
Klasse III	Weich, strukturarm, unterdurchschnittlich

Eine in-vitro Differenzierung zwischen Gewebe des Annulus fibrosus und Nucleus pulposus wurde nicht vorgenommen, da dies im Sinne der Fragestellung nicht erforderlich war, sondern vielmehr die Untersuchung der Bandscheibenchondrozyten im Allgemeinen im Fokus stand.

#### Isolierung der Chondrone und Chondrozyten

Die Gewebeproben wurden mittels Skalpell in 1mm x 1mm x1mm große Stücke zerteilt und auf zwei Probenröhrchen (BlueCap, 50ml) aufgeteilt. Im Anschluss wurden die Gewebeproben mit DPBS gewaschen um anhaftende Blutreste zu entfernen. Hierfür wurden die Probenröhrchen für ca. 5 Minuten auf dem Rüttler unter sanften Bewegungen gelagert. Die Waschungen wurden so lange wiederholt, bis keine sichtbare Verfärbung des PBS mehr erkennbar war. Die Flüssigkeit wurde abzentrifugiert (7 min, 1500U/min, 21 °C) und das Gewebepellet mit den Verdauungsenzymen vermischt.

**Tabelle 10. Übersicht Gewebeverdau**

Chondronverdau	2ml Collagenase XI + 8ml Dispase II für 3 Stunden bei 37°C
Chondrozytenverdau	2ml Collagenase XI + 4ml Dispase II + 8ml DMEM für 16 Stunden bei 37°C

Für die Isolierung der Chondrone wurde das vorbereitete Gewebe mit einem Enzymgemisch aus 2ml Collagenase XI und 8ml Dispase II für 3 Stunden bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Inkubator verwahrt. Der Chondrozytenverdau erfolgte mittels 2ml Collagenase XI, 4ml Dispase II sowie 8ml DMEM. Die Isolierung der Chondrozyten erfolgte ebenfalls bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Inkubator und dauerte 16 Stunden. Die Probenröhrchen wurden jeweils auf Magnetrührern gelagert und mittels eines Rührfisches in Bewegung gehalten, sodass ein gleichmäßiger Verdau gewährleistet werden konnte.

Nach Ablauf der Zeit wurde das Gewebe-Enzym-Gemisch durch ein Zellsieb (100µm) in ein weiteres Probenröhrchen (BlueCap, 50ml) filtriert. Unverdaute Gewebereste oder Knochensplitter konnten so herausgefiltert werden. Der enzymatische Verdau wurde durch Zugabe von 40ml DPBS gestoppt. Es folgte ein 3maliges Waschen mit DPBS. Zwischen den Waschgängen wurde die Zellsuspension zentrifugiert (7min, 1500 U/min, 21°C), der Überstand abgenommen, durch 50ml frisches DPBS ersetzt und das Zellpellet resuspendiert. Nach Abschluss des 3. Waschgangs wurde das Pellet in 10ml DMEM resuspendiert.

#### Bestimmung der Zellanzahl

Zur Bestimmung der Zellanzahl wurde die Zellsuspension mit 0,4-%-iger Trypanblaulösung im Verhältnis 1:1 (10µl:10µl) vermischt und eine Neubauer-Zählkammer damit beschickt. Die Auszählung erfolgte bei 20-facher Vergrößerung mittels Handzähler in zwei sich gegenüberliegenden Großquadraten (links oben und rechts unten) (Seitenlänge: 1mm, Tiefe: 0,1mm, Volumen: 0,1mm<sup>2</sup>=0,1µl) mit je 16 Gruppenquadraten (Seitenlänge: 0,25mm, Tiefe: 0,1mm, Volumen: 0,006mm<sup>2</sup>=0,006µl).

Mit folgender Formel konnte die Gesamtzellanzahl errechnet werden:

$$\text{Gesamtzahl} = \frac{n_{\text{Zellen}}}{n_{\text{Quadrate}}} \times \text{RV} \times \text{VF} \times 10^4$$

$N_{\text{Zellen}}$ = Anzahl der gezählten Zellen

$N_{\text{Quadrate}}$ = Anzahl der gezählten Quadrate

RV= Restvolumen in ml

VF= Verdünnungsfaktor=2

Bei der Zählung wurden nur Zellen berücksichtigt, die keine Blaufärbung aufwiesen und bei denen somit davon ausgegangen werden konnte, dass diese intakt und vital waren.

#### **2.2.1.2 Herstellung der Alginat – und Citratlösung**

Für die Kultivierung der Chondrone und Chondrozyten war es notwendig ein dreidimensionaler Wachstumsraum zu erschaffen. Chondrozyten die in zweidimensionalen Kulturen wachsen, so genannten Monolayer-Kulturen, verändern unter diesen Kulturbedingungen ihren Phänotyp. Dies geht mit einem Verlust ihrer rundlichen Morphologie einher, hierbei entstehen fibroblastenartige Zellen (Vonk et al., 2010) (Abbildung 5 A). Es erfolgt eine Umstellung der Kollagensynthese von Typ II, IX und XI hin zu Typ I (Domm C et al., 2000), sowie eine verminderte Proteoglycansynthese (Vonk et al., 2010).

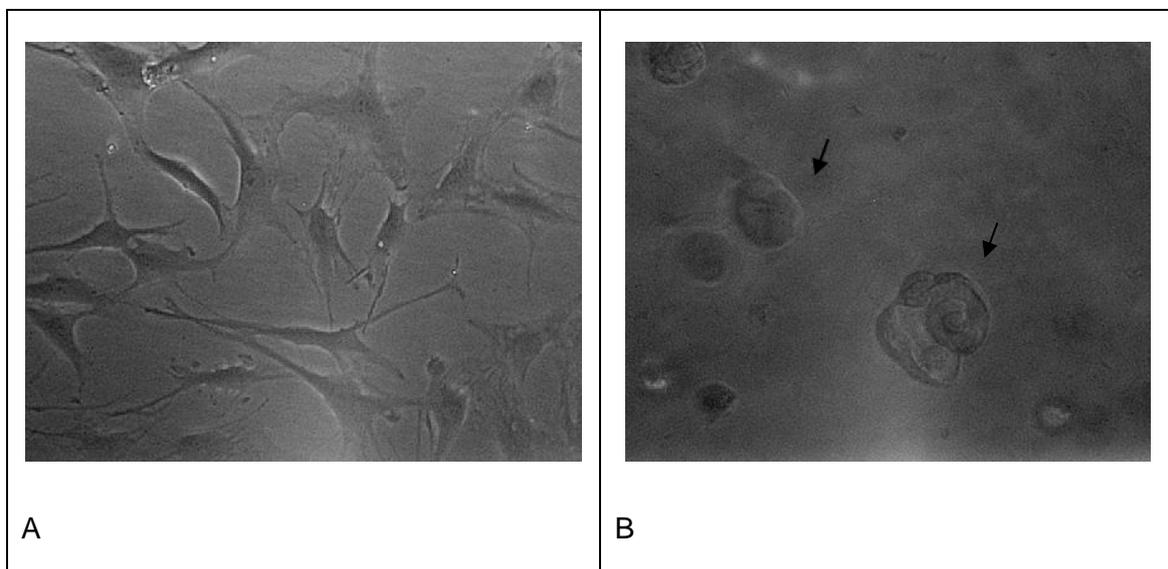
Alginat ist das Salz der Alginsäure und wird aus Braunalgen gewonnen. Das Polysaccharid, bestehend aus den Teilstrukturen  $\beta$ -D-Mannuronsäure und  $\alpha$ -L-Guluronsäure, eignet sich als 3-D-Matrix für die Kultivierung von Bandscheibenzellen und löst sich im Vergleich zu anderen dreidimensionalen Wachstumsmedien (z.B. Agarose) leicht in Calciumchelatoren, sodass die Zellanzahl nach abzentrifugieren der Flüssigkeit ermittelt werden kann (Domm C et al., 2000).

Alginat ist bei Raumtemperatur schlecht wasserlöslich. Für die Herstellung der 1,25%-igen Alginatlösung wurde zunächst eine 0,9%-ige NaCl-Lösung

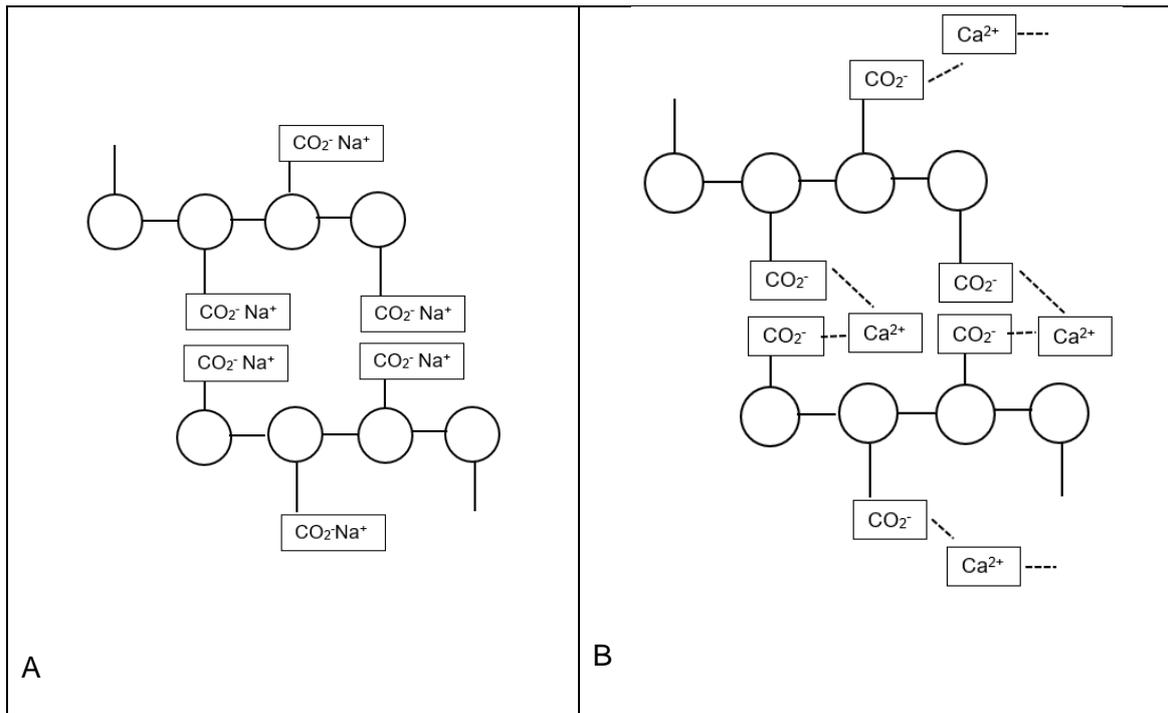
hergestellt. Nach Zugabe des Alginatpulvers wurde diese auf 65°C im Wasserbad erwärmt und mehrfach durchgerührt, bis sich alle festen Bestandteile aufgelöst hatten. Die Herstellung der Alginatkügelchen, die als Matrix für die Zellkultivierung geformt wurden, beruht auf einer Ionenaustauschreaktion, die bei Kontakt des Alginates mit einer Calciumchloridlösung ausgelöst wird. Hierbei werden Natriumionen durch Calciumionen ersetzt, die auf Grund ihrer zwei freien Bildungsstellen eine Vernetzung der einzelnen Polymerstränge bedingen (Abbildung 6).

Die Verflüssigung des Alginatgels erfolgte nach Abschluss der Wachstumsphase in einer Citratlösung. Für die Herstellung der Lösung wurden Citrat (55mM), EDTA (30mM), NaCl (0,15M) und Hepes (10mM) in destilliertem Wasser gelöst. Um die Zellen vor der Auszählung nicht zu beschädigen wurde hierbei der pH-Wert auf 7,3 justiert.

Im Anschluss wurden die Alginat-, sowie die Citratlösung autoklaviert und bis zur Verwendung im Kühlschrank bei 4°C gelagert.



**Abbildung 5. Bandscheibenzellen bei 20-facher Vergrößerung unter einem Lichtmikroskop.** *Fibroblastenartige Zellen durch Kultivierung in einer Monolayerkultur (A). Chondron (schwarze Pfeile) in 3-D-Kultivierung der Bandscheibenzellen in Alginat (B).*



**Abbildung 6. Schematische Darstellung der Strukturformel von Alginat (vereinfacht).** Alginat liegt als Polysaccharid vor (A). Vernetzung der Polymerstränge durch eine Ionenaustauschreaktion von  $\text{Na}^+$ -Ionen und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bei Kontakt des Alginates mit einer Calciumchloridlösung.

### 2.2.1.3 Kultivierung der Zellen in Alginat

Das zuvor gewonnene Zellpellet wurde in einem Verhältnis von  $10^6$  Zellen/ml Alginat unter vorsichtigem mehrmaligem resuspendieren (Pipette, 5ml) mit 1,25%-iger Alginatlösung vermischt und mit einer Insulinspritze (Fassungsvermögen 1ml) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde mit einer 25G-Nadel in 5ml 102mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung getropft und bis zur Auspolymerisation bei sanften Bewegungen auf der Rüttelplatte gelagert. Dies gewährleistete, dass sich die Alginat-Zell-Kügelchen vor ihrer vollständigen Polymerisation nicht am Boden absetzen konnten und somit eine kugelhähnliche Form erhielten. Hierbei wurden 15 Alginatkugeln pro well (6-well-cell culture plate) geformt. Nach 15min wurde die  $\text{CaCl}_2$ -Lösung abpipettiert und mit jeweils 3ml DMEM+10%FCS+1%PenStrep versehen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ . Das Zellkulturmedium wurde alle 3 Tage

gewechselt. Hierbei wurden stets 1ml des Mediums belassen und 3ml frisches DMEM+10%FCS+1%PenStrep hinzugegeben.

#### **2.2.1.4 Auflösen der Alginatekugeln und Ermittlung der Zellzahl**

Zur Bestimmung der Zellanzahl nach Kultivierung in Alginate wurden die Alginatekugeln zunächst in einem 2ml Eppendorf-Röhrchen gewogen und anschließend in 5ml 55mM Citrat-Lösung (6-well cell plate) aufgelöst. Die herausgelösten Zellen wurden abzentrifugiert (7min, 1500 U/min, 21°C) und der Überstand abgenommen. Anschließend erfolgte die Ermittlung der Zellanzahl, wie oben beschrieben (2.2.1.1 Bestimmung der Zellanzahl) und die Umrechnung in Zellen/Gramm Alginate.

### **2.2.2 Wachstumsverhalten**

#### **2.2.2.1 Wachstumsverhalten in Abhängigkeit der perizellulären Matrix**

Um einen Überblick über das Wachstumsverhalten von Bandscheibenzellen mit und ohne perizellulärer Matrix zu erlangen, wurden die Bandscheiben mit zwei unterschiedlichen Enzymansätzen (Chondron- und Chondrozytenverdau) verdaut und getrennt kultiviert. Im 3-Tages-Rhythmus wurden jeweils 10 Alginatekugeln aufgelöst und die Zellanzahl ermittelt. Die erste Zählung erfolgte nach 7 Tagen, die letzte Zählung an Tag 34.

#### **2.2.2.2 Wachstumsverhalten unter medikamentösem Einfluss**

##### **2.2.2.2.1 Medikamentendosis**

Um den Einfluss der ausgewählten Medikamente auf das Wachstumsverhalten von Chondrozyten zu bestimmen wurde zunächst die zu verwendende Medikamentendosis festgelegt. Diese entspricht der maximalen Plasmakonzentration ( $C_{max}$ ). Die entsprechenden Werte konnten an Hand der roten Liste ermittelt werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass bei

fachgerechter Anwendung keine höhere Konzentration am Zielorgan möglich ist.

**Tabelle 11. Übersicht der verwendeten Medikamentendosen**

<b>Wirkstoff</b>	<b>Handelsname</b>	<b>C<sub>max</sub></b>
Paracetamol	Kabi Infusionslösung	30µg/ml
Ibuprofen	Nurofensaft 4%	50µg/ml
Diclofenac	Diclac	1,6µg/ml
Prednisolon	Prednisolut	458ng/ml
Anakinra	Kineret	208ng/ml
Tocilizumab	RoActemra	10µg/ml
Adalimumab	Humira	5µg/ml
IL-1β	IL-1β human	10ng/ml

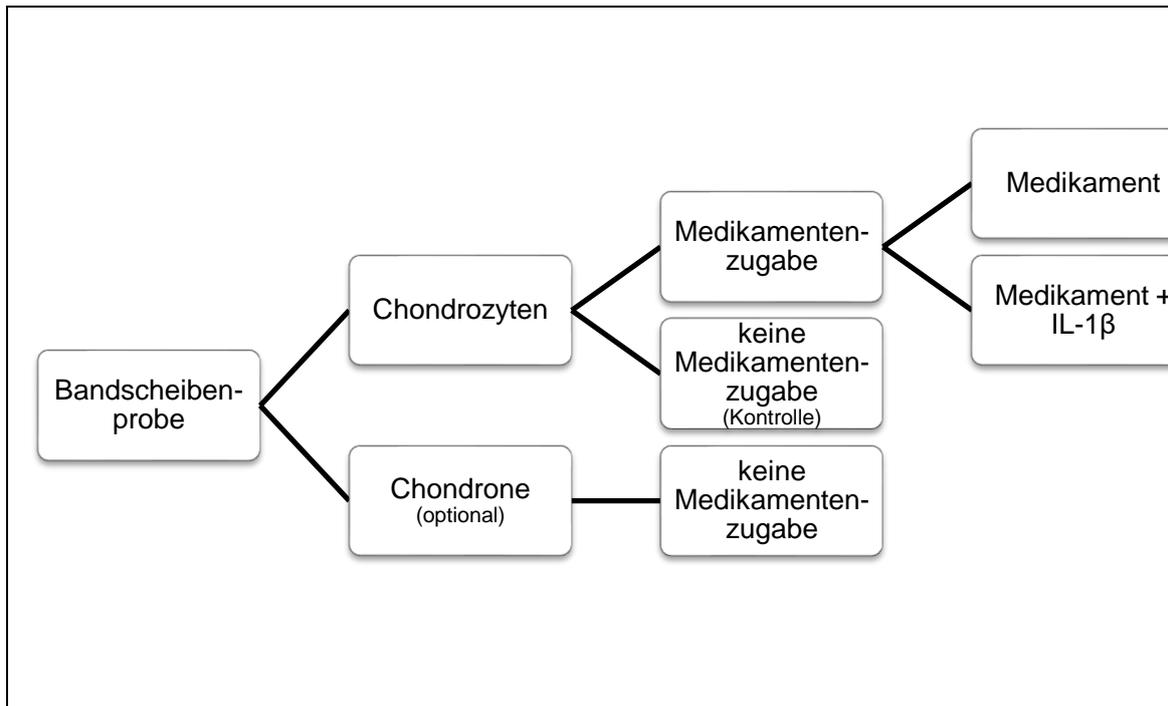
#### **2.2.2.2.2 Aliquotierung der Medikamente**

Die verwendeten Medikamente wurden im Vorfeld mittels steriler physiologischer Kochsalzlösung unter der Sterilbank verdünnt. Die Aliquots wurden in 2ml Eppendorf Tubes bei -20°C gelagert.

#### **2.2.2.2.3 Versuchsaufbau**

Die Isolation und Kultivierung der Zellen erfolgte wie unter 2.2.1 beschrieben. Hierbei wurde eine Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml Alginat angestrebt. Es wurden jeweils 15 Kugeln/well (6-well cell plate) geformt. Zusätzlich zu 3ml DMEM+ 10% FCS+ 1%Pen/Strep erhielten die Zellen die unter 2.2.2.2.1. genannte Medikamentendosis, die beim Mediumwechsel (an jedem 3. Tag) erneut hinzugegeben wurde. Des Weiteren wurde jedes Medikament zusätzlich unter Zugabe von IL-1β angewendet. Eine Kontrollkultur ohne Medikamentenzugabe

oder Zugabe von IL-1 $\beta$  wurde stets durchgeführt. War ausreichend Bandscheibengewebe vorhanden wurde zusätzlich ein Chondron-Verdau durchgeführt (Abbildung 7). Die Ermittlung der Zellanzahl erfolgte, wie oben beschrieben, an Tag 19.



**Abbildung 7. Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.** Aus jeder Bandscheibenprobe wurden Chondrozyten und Chondrone (optional) isoliert. Die Chondrozytenkulturen erhielten neben ihrem Nährmedium eine Medikamentenzugabe. Jedes Medikament wurde ebenfalls in einem zusätzlichen Experiment unter Zugabe von IL-1 $\beta$  angewendet. Die Kontrollgruppe der Chondrozyten erhielt weder eine Medikamentenzugabe noch IL-1 $\beta$ . Bei zusätzlicher Isolierung von Chondronen wurden diese ausschließlich in Nährmedium kultiviert.

### 2.2.3 Auswertung der Gewebeproben

Die für die Auswertung relevanten Patientendaten wurden pseudonymisiert in einer Excel-Tabelle gesammelt. Sie umfassten das Alter des Patienten zum Operationszeitpunkt, das Geschlecht, die Beschwerdedauer laut Arztbrief (<4 Wochen, 4Wochen bis 1 Jahr, > 1 Jahr), die, falls stattgefunden, Durchführung einer entzündungshemmenden präoperativen Medikation mit Corticosteroiden, das Operationsdatum, das Operationsverfahren, sowie das betroffene

Bandscheibenfach. Des Weiteren wurden Daten zu den einzelnen Gewebeproben erhoben. Hierbei wurde das Gewebe durch optische und haptische Beurteilung in drei Klassen eingeteilt. Eine Gewebeprobe, die am Stück und überdurchschnittlich gut erschien, sowie unter Druckbelastung elastisch zurückfederte zählte zu Klasse I. Bei weniger elastischem Rückstellverhalten, sowie aufgefaserter Gewebestruktur fiel das Gewebe in Klasse II. Klasse III wurde gewählt, wenn die Gewebeprobe unterdurchschnittlich, weich und strukturarm war.

An Hand der präoperativen MRT-Bilder (in T2-Wichtung) können altersbedingte Veränderungen und degenerative Veränderungen beurteilt werden. Der hierfür verwendete ordinal skalierte Pfirrmann-Score wird folgendermaßen unterteilt: Grad 1 beschreibt eine homogene Struktur mit hellem hyperintensem Kern und normaler Bandscheibenhöhe. Bei Inhomogenität des Bandscheibengewebes und klar abgrenzbarem, hellem, hyperintensem Kern (mit oder ohne horizontaler grauer Bande), sowie normaler Bandscheibenhöhe wird Grad 2 gewählt. Bei Grad 3 ist keine Differenzierung zwischen Nucleus und Annulus möglich. Die Gewebestruktur ist inhomogen, der Kern weist graue Banden auf und die Bandscheibenhöhe kann vermindert sein. Bei Vorliegen einer Grad-4-Degeneration ist eine Unterscheidung zwischen Nucleus und Annulus nicht mehr möglich, die Bandscheibenstruktur ist inhomogen und die Signalintensität des Nucleus hypointens. Die Bandscheibenhöhe kann normal oder moderat verringert sein. Bei stark verringerter Bandscheibenhöhe, mit hypointenser Signalintensität des Nucleus und inhomogenem Bandscheibengewebe, sowie einem völligen Verlust der Differenzierungsmerkmale zwischen Nucleus und Annulus liegt ein Grad 5 nach Pfirrmann vor (Pfirrmann et al., 2001).

Die Abschlusskategorisierung des Gewebes erfolgte unter Berücksichtigung der Anamnese, des Pfirrmann-Scores und des konventionellen Röntgenbildes. Hierbei wurde zwischen Trauma, akutem (< 4 Wochen) oder chronischem Bandscheibenvorfall (> 4 Wochen) und mäßiger oder ausgeprägter Degeneration unterschieden.

Zur Auswertung der Zellkulturen wurden die Art des Gewebeverdaus (Chondron- oder Chondrozytenverdaus), die Zugabe von Medikamenten bzw. IL-1 $\beta$  und die ermittelte Zellanzahl dokumentiert.

#### **2.2.4 Statistische Auswertung**

Kategorische Daten werden als absolute und relative Häufigkeiten wiedergegeben. Variablen wurden anhand von Histogrammen auf Normalverteilung überprüft. Normalverteilte Daten werden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben, nicht normalverteilte Daten als Median (Minimum-Maximum). Die graphische Darstellung erfolgt für absolute und relative Häufigkeiten mittels Kreisdiagrammen, Histogrammen und Balkendiagrammen. Ergebnisse werden im Falle von nicht-Normalverteilung in Form von Boxplots dargestellt.

Unterschiede zwischen nicht-normalverteilten und statistisch abhängigen Variablen wurden mittels Wilcoxon-Test berechnet. Bei einer Anzahl von mehr als zwei Variablen wurden die Unterschiede mittels Friedmann-Test berechnet, die post-hoc Testung erfolgte hierbei mittels Dunn-Bonferroni-Test. Bei statistisch unabhängigen Variablen erfolgte bei zwei Variablen die Durchführung des Mann-Whitney-U-Testes und bei mehr als zwei Variablen des Kruskal-Wallis-Testes. Als Signifikanzniveau wurde ein alpha von 0,05 festgelegt. Eine alpha-Adjustierung für multiples Testen erfolgte nicht, aber alle berechneten p-Werte werden dargestellt.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Statistikprogramms SPSS22.

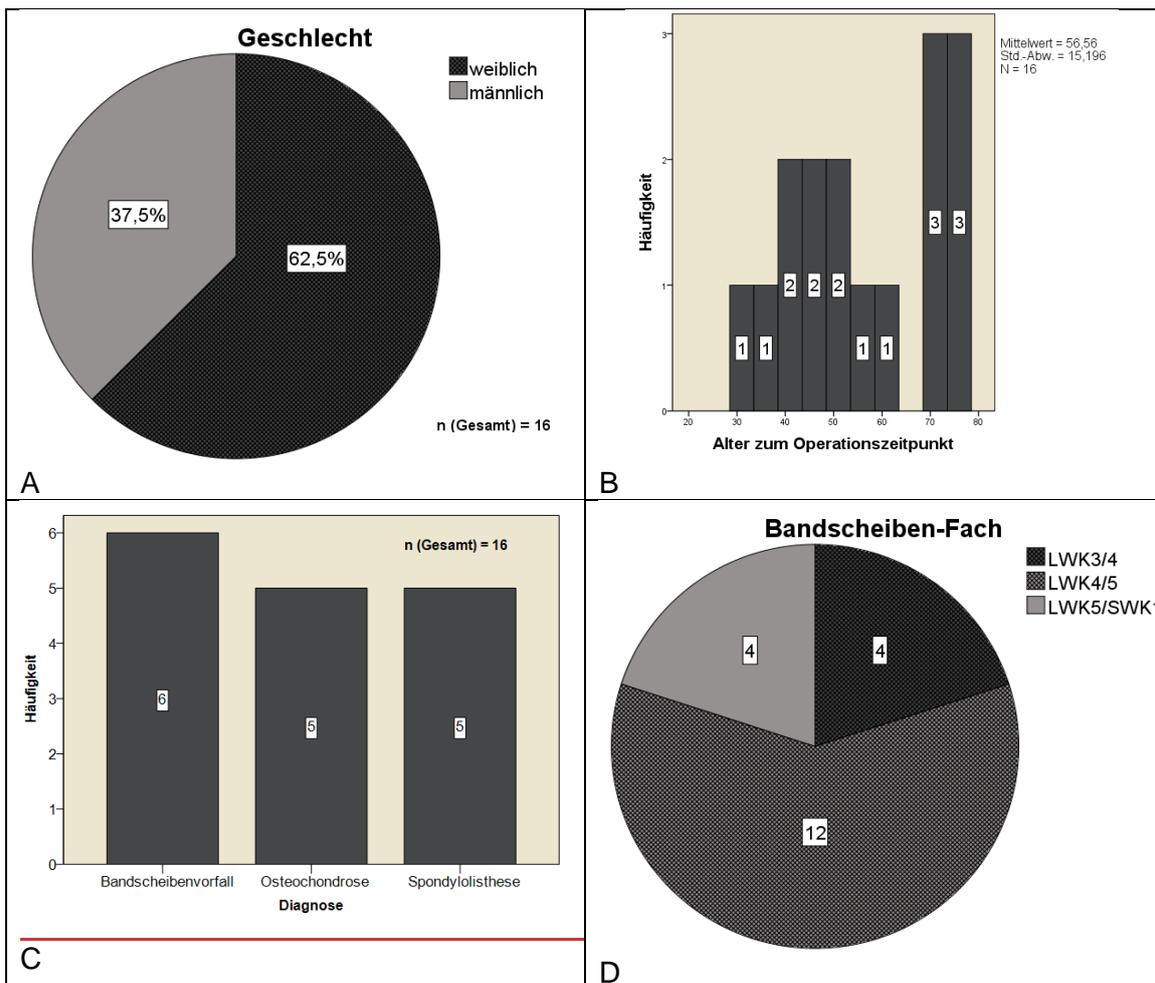
### **3 Ergebnisse**

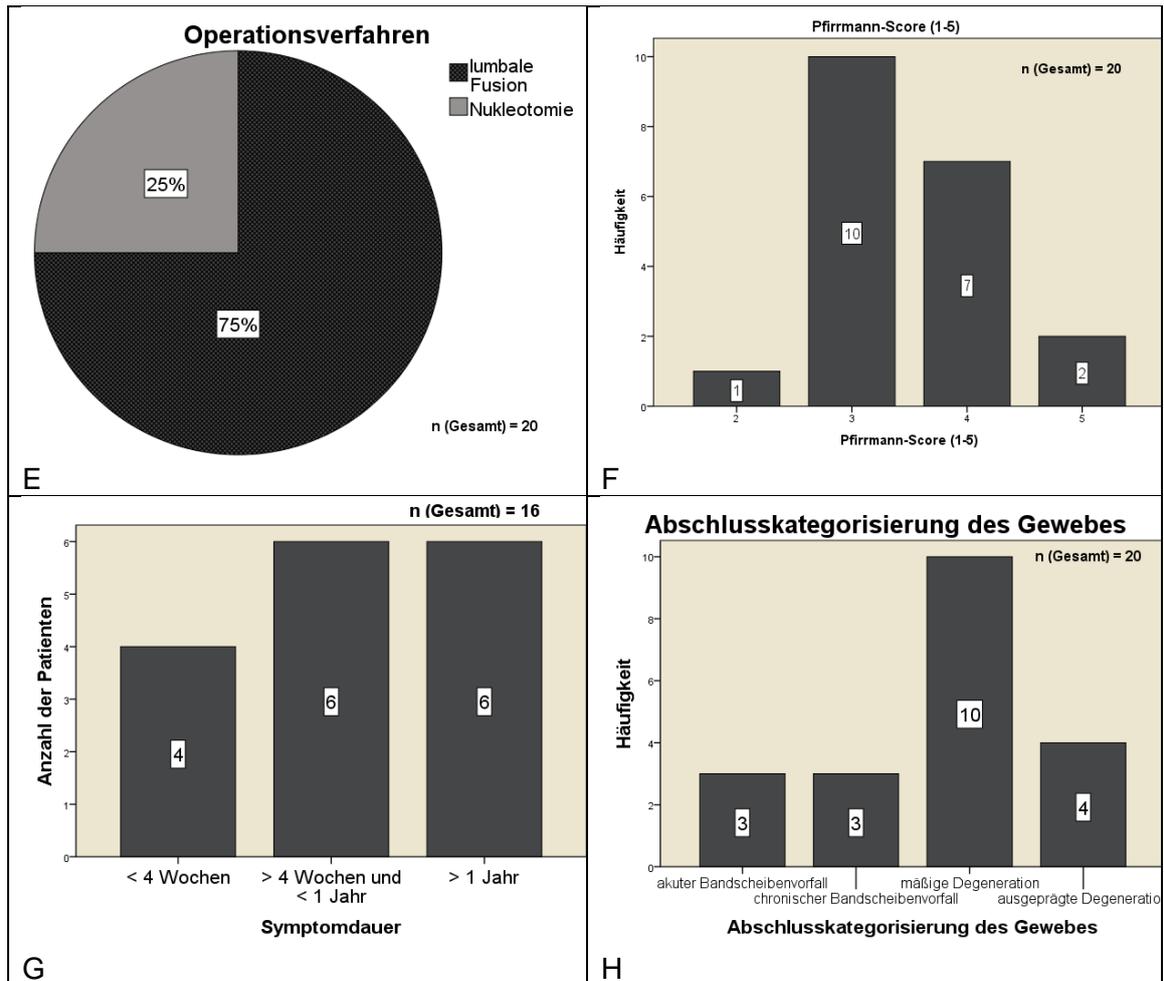
#### **3.1 Wachstumskurve mit/ohne PCM**

##### **3.1.1 Datenanalyse des untersuchten Patientenkollektivs**

In der durchgeführten Studie wurden zwei Fragestellungen untersucht. Zunächst wurde eine Wachstumskurve erstellt, die die Veränderung der

Zellanzahl der Bandscheibenzellen mit und ohne perizellulärer Matrix aufzeigt und in Abhängigkeit des Degenerationsgrades des Bandscheibengewebes, darstellt. Hierfür wurden 20 Bandscheibenproben von 16 verschiedenen Patienten ausgewertet. Bei vier Patienten wurden jeweils zwei Bandscheiben in die Studie eingeschlossen. Bei allen weiteren Patienten wurde eine Bandscheibe operativ entfernt.





**Abbildung 8. Biometrische Daten zu den untersuchten Bandscheiben und Kategorisierung der Degeneration** (A) Das Kreisdiagramm zeigt die **Geschlechterverteilung** der eingeschlossenen Patienten. (B) Das Histogramm zeigt die Verteilung des **Alters der Patienten zum Zeitpunkt der OP**. (C) Das Balkendiagramm zeigt die gestellten **Diagnosen**, auf Grund welcher die in die Studie eingeschlossenen Patienten operiert wurden. (D) Das Balkendiagramm zeigt aus welchem **Bandscheibenfach** das untersuchte Gewebe entnommen wurde. (E) Das Kreisdiagramm verbildlicht das gewählte **Operationsverfahren**. 75% der ausgewerteten Bandscheiben wurden durch eine lumbale Fusion gewonnen. (F) Das Balkendiagramm zeigt die qualitative **Einteilung des Bandscheibengewebes nach Pfirrmann**. (G) Das Balkendiagramm zeigt die annähernd gleichverteilte **Symptombdauer vor OP-Beginn**. (H) Das Balkendiagramm zeigt die **Abschlusskategorisierung** der untersuchten Bandscheibenproben. Der Fokus der Gewebeproben liegt auf degeneriertem Bandscheibengewebe.

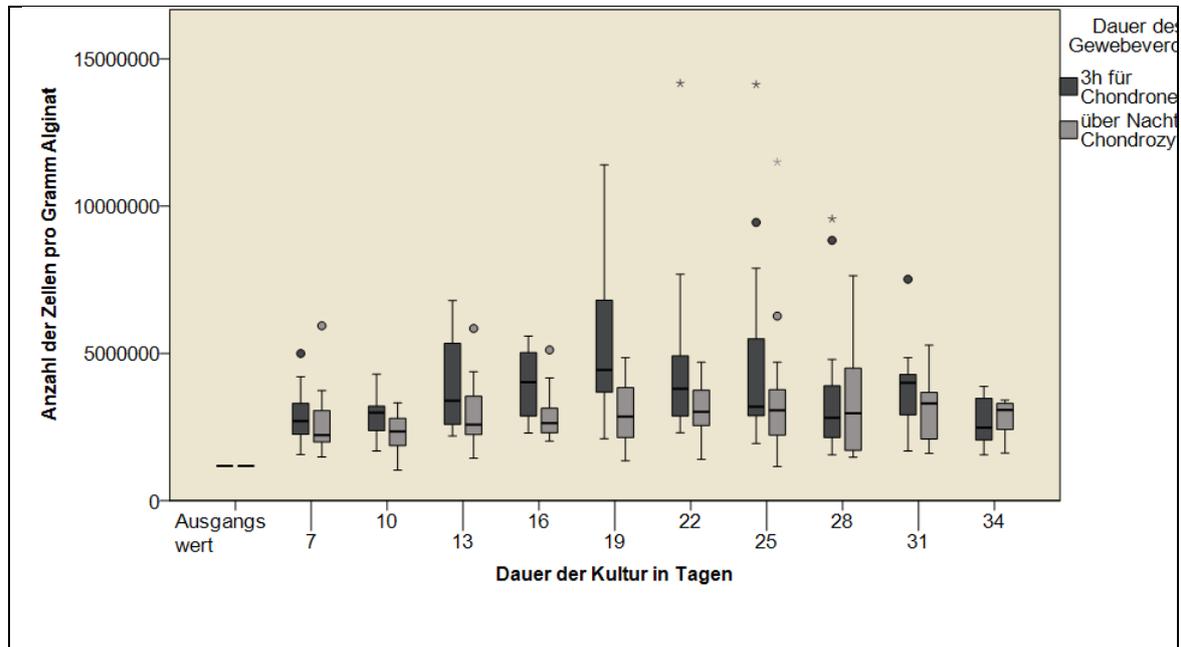
6 der untersuchten Patienten waren männlich und 10 der untersuchten Patienten waren weiblich. Dies entspricht einem prozentualen Anteil von 37,5% bzw. 62,5% (Abbildung 8 A). Das Alter der Patienten zum Operationszeitpunkt präsentiert sich mit zwei Altersgipfeln. Der Median des Patientenalters liegt bei 54,5 Jahren mit einer Altersspanne von 31 bis 78 Jahren (Abbildung 8 B). Die

---

vor Operationsbeginn gestellten Diagnosen verteilen sich annähernd gleichmäßig auf das Vorliegen einer Osteochondrose, eines Bandscheibenvorfalles oder einer Spondylolisthese (Abbildung 8 C). Alle untersuchten Stichproben wurden der Lendenwirbelsäule entnommen. 12 der 20 untersuchten Bandscheiben entstammten dem Zwischenwirbelraum LWK 4/5. Die restlichen 8 Bandscheiben wurden gleichermaßen zwischen LWK 3/4 und LWK 5/ SWK 1 entnommen (Abbildung 8 D). Die untersuchten Bandscheiben wurden mittels Instrumentationsspondylodese, also lumbaler Fusion gewonnen (75%) oder im Rahmen einer Nucleotomie entfernt (25%) (Abbildung 8 E). Die qualitative Einteilung der Bandscheibenproben erfolgte mittels des ordinal skalierten Pfirrmann-Scores, der sich an den präoperativ angefertigten MRT-Bildern orientiert. 85% der untersuchten Bandscheibenproben wurden Grad 3 oder 4 zugeordnet. Grad 3 beschreibt bereits den Differenzierungsverlust zwischen Nucleus und Annulus, Grad 4 geht zusätzlich mit einer inhomogenen Bandscheibenstruktur einher. Lediglich eine der hier untersuchten Bandscheiben wies laut MRT noch einen klar abgrenzbaren, hyperintensiven Kern auf und wurde somit Grad 2 zugeordnet. Eine Grad-5-Degeneration beschreibt den völligen Verlust der Differenzierungsmerkmale zwischen den einzelnen Anteilen der Bandscheibe und geht mit einer stark verringerten Bandscheibenhöhe einher. 2 der 20 in die Studie eingeschlossenen Bandscheiben waren diesem Grad zuzuordnen (Abbildung 8 F). Die Symptombdauer wurde in 3 Kategorien eingeteilt. 25% der Patienten hatten vor dem operativen Eingriff weniger als 4 Wochen Beschwerden. 37,5% der Patienten hatten zwischen 4 Wochen und einem Jahr Beschwerden und weitere 37,5% litten bereits über ein Jahr unter Schmerzen bevor eine Operation durchgeführt wurde (Abbildung 8 G). Die Abschlusskategorisierung des Gewebes erfolgte unter Berücksichtigung der Anamnese, des Pfirrmann-Scores und des konventionellen Röntgenbildes. 30% der untersuchten Bandscheibenproben stammen von Patienten mit Bandscheibenvorfällen. Jeweils die Hälfte hiervon ist einer akuten Symptomatik (< 4 Wochen), die andere Hälfte einer chronischen Symptomatik (>4 Wochen)

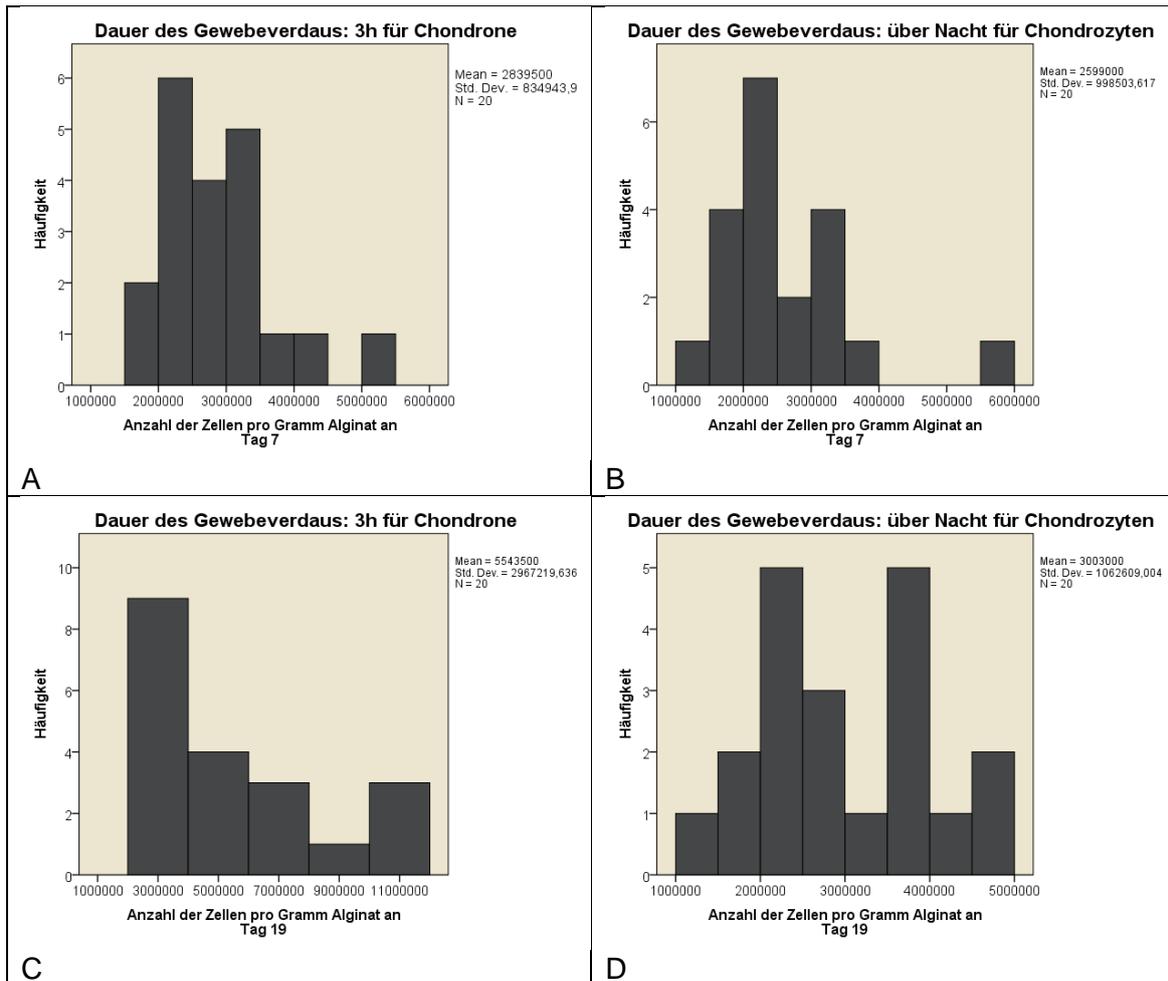
zuzuordnen. Die übrigen 70% der Gewebeproben teilen sich auf eine mäßige (50%) und eine ausgeprägte Degeneration (20%) auf (Abbildung 8 H).

### 3.1.2 Veränderung der Zellanzahl mit / ohne PCM



**Abbildung 9. Veränderungen der Zellanzahl von Chondronen und Chondrozyten.** Der Boxplot zeigt die Zellanzahl der Chondrone und Chondrozyten zu den unterschiedlichen Auszählungszeitpunkten. Der Ausgangswert für alle Kulturen lag bei 1 000 000 Zellen pro Gramm Alginate. Die größte Diskrepanz hinsichtlich der Zellanzahl zwischen den beiden Studienarmen besteht an Tag 19.

Über eine Kultivierungsdauer von 34 Tagen kann sowohl bei den Chondronen als auch bei den Chondrozyten zunächst ein Anstieg der Zellanzahl beobachtet werden, der sein Maximum an Tag 19 (Chondrone) bzw. an Tag 25 (Chondrozyten) erreicht, bevor es danach wieder zu einem leichten Abfall kommt. Im Allgemeinen verläuft die Wachstumskurve bei den Chondrozyten etwas flacher. Im direkten Vergleich fällt auf, dass die Zellanzahl zum entsprechenden Auszählungszeitpunkt bei den Chondronen im Allgemeinen höher ist. Lediglich an Tag 28 liegt der Wert der Chondrozyten leicht über denen der Chondrone. Die größte Diskrepanz zwischen den Zellzahlen besteht an Tag 19. Für alle angelegten Kulturen lag der Ausgangswert bei 1 000 000 Zellen pro Gramm Alginate (Abbildung 9).



**Abbildung 10. Häufigkeitsverteilung der Zellanzahl an Tag 7 und an Tag 19 für Chondrone und Chondrozyten.** Die Häufigkeitsverteilung der Zellanzahl an Tag 7 der Chondrone (A) und Chondrozyten (B) ist grenzwertig normalverteilt. Die Häufigkeitsverteilung der Zellanzahl an Tag 19 für Chondrone (C) und Chondrozyten (D) zeigt keine Normalverteilung. Der Degenerationsgrad der untersuchten Gewebeproben findet keine Berücksichtigung.

Der Ausgangswert aller Kulturen betrug 1 000 000 Zellen pro Gramm Alginat. An Tag 7 nach Kultivierung der Zellen in Alginat wurden die Alginatkugeln das erste Mal aufgelöst und die Zellen ausgezählt. Zu diesem Zeitpunkt kann nur ein geringfügiger Unterschied in der Zellanzahl zwischen Chondronen und Chondrozyten beobachtet werden. Der Mittelwert liegt bei 2 839 500 ( $\pm$  834 943) Zellen pro Gramm Alginat (Abbildung 10 A) für Chondrone und bei 2 599 000 ( $\pm$ 998 503) Zellen pro Gramm Alginat für Chondrozyten (Abbildung 10 B). Es konnte beobachtet werden, dass sich die Chondrone in den meisten

Zellkulturen (90%) mindestens verdoppelt oder sogar verdreifacht haben. Die Zellanzahl in 3 der 20 ausgewerteten Kulturen stieg um mehr als das 3-fache an (Abbildung 10 A). Bei den über einen längeren Verdau isolierten Chondrozyten weisen 13 der 20 ausgewerteten Kulturen nach 7 Tagen mindestens eine Verdopplung der Zellanzahl auf (Abbildung 10 B). Die Datensätze sind grenzwertig normalverteilt.

Nach 19 Tagen haben sich die Zellanzahlen aller ausgewerteten Zellkulturen, welche Chondrone enthielten, mindestens verdoppelt. 4 der 20 angelegten Kulturen weisen die fünffache Zellanzahl im Vergleich zum Ausgangswert, jeweils 3 weitere Kulturen den sieben-bzw. elffachen Wert auf. In einer Kultur hat sich die Zellanzahl um das neunfache erhöht. Der Mittelwert der Zellanzahl an Tag 19 liegt bei 5 543 500 ( $\pm 2 967 2919$ ) Zellen pro Gramm Alginat. Die Kurve weist eine nach linksschiefe Verteilung auf. Der Datensatz ist nicht normalverteilt (Abbildung 10 C). Der Mittelwert der ermittelten Zellzahlen der Chondrozyten an Tag 19 liegt bei etwa der Hälfte (3 003 100  $\pm$  1 062 609 Zellen pro Gramm Alginat). Jeweils 5 der ausgewerteten Kulturen haben ihre Zellanzahl verdoppelt bzw. vervierfacht. Drei Zellkulturen wiesen bei der Auszählung die 2,5-fache Zellanzahl im Vergleich zum Ausgangswert auf. Die Zellzahlen jeweils zwei weiterer Kulturen stiegen auf den zwei- bzw. 4,5-fachen Wert an. Bei einer Kultur war keine Veränderung der Zellanzahl zu beobachten (Abbildung 10 D).

<b>Chondrone</b>	<b>Chondrozyten</b>
p= 0,003	p=0,003

**Tabelle 12: Friedman-Test.** Es ergeben sich jeweils signifikante Unterschiede innerhalb der Wachstumskurven für die zu den an den jeweiligen Auszählungstagen ermittelten Zellzahlen der Chondrone ( $p=0,003$ ) und Chondrozyten ( $p= 0,003$ ).

Die mittels Friedman-Test durchgeführte Analyse zeigt signifikante Unterschiede innerhalb der Wachstumskurven für die an den jeweiligen Auszählungstagen ermittelten Zellzahlen für Chondrone ( $p=0,003$ ) und Chondrozyten ( $p=0,003$ ). In der post-hoc Analyse ergeben sich mittels Dunn-Bonferroni-Testung für die durch einen drei stündigen Verdau gewonnenen Chondrone signifikante Werte beim Vergleich von Tag 1 und Tag 13 ( $p=0,022$ ), Tag 1 und Tag 16 ( $p=0,008$ ), Tag 1 und Tag 19 ( $p=0,006$ ), Tag 1 und Tag 22 ( $p=0,016$ ), Tag 1 und Tag 25 ( $p=0,045$ ) und Tag 1 und Tag 31 ( $p=0,022$ ) (Tabelle 13)

Die Chondrozyten, welche durch einen Verdau über Nacht isoliert wurden sind signifikante Ergebnisse beim Vergleich von Tag 1 und Tag 22 ( $p= 0,039$ ), Tag 1 und Tag 25 ( $p= 0,016$ ), Tag 1 und Tag 28 ( $p= 0,022$ ) und für Tag 1 und Tag 31 ( $p= 0,003$ ) zu beobachten (Tabelle 14).

	Tag 1	Tag 7	Tag 10	Tag 13	Tag 16	Tag 19	Tag 22	Tag 25	Tag 28	Tag 31	Tag 34
Tag 1		$p=0,431$	$p=0,960$	<b><math>p=0,022</math></b>	<b><math>p=0,008</math></b>	<b><math>p=0,006</math></b>	<b><math>p=0,016</math></b>	<b><math>p=0,045</math></b>	$p>0,999$	<b><math>p=0,022</math></b>	$p>0,999$
Tag 7			$p>0,999$	$p>0,999$	$p>0,999$	$p>0,999$	$p>0,999$	$p>0,999$	$p>0,999$	$p>0,999$	$p>0,999$
Tag 10				$p>0,999$	$p>0,999$	$p>0,999$	$p>0,999$	$p>0,999$	$p>0,999$	$p>0,999$	$p>0,999$
Tag 13					$p>0,999$	$p>0,999$	$p>0,999$	$p>0,999$	$p>0,999$	$p>0,999$	$p>0,999$
Tag 16						$p>0,999$	$p>0,999$	$p>0,999$	$p>0,999$	$p>0,999$	$p>0,999$
Tag 19							$p>0,999$	$p>0,999$	$p>0,999$	$p>0,999$	$p>0,999$
Tag 22								$p>0,999$	$p>0,999$	$p>0,999$	$p>0,999$
Tag 25									$p>0,999$	$p>0,999$	$p>0,999$
Tag 28										$p>0,999$	$p>0,999$
Tag 31											$p>0,999$
Tag 34											

**Tabelle 13. Post-hoc-Analyse mittels Dunn-Bonferroni-Test für Chondrone.** Hierbei ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Auszählungszeitpunkten Tag 1 und Tag 13 ( $p=0,022$ ), Tag 1 und Tag 16 ( $p=0,008$ ), Tag 1 und Tag 19 ( $p=0,006$ ), Tag 1 und Tag 22 ( $p=0,016$ ), Tag 1 und Tag 25 ( $p=0,045$ ) und Tag 1 und Tag 31 ( $p=0,022$ ). Hierbei findet der Degenerationsgrad des untersuchten Gewebes keine Berücksichtigung.

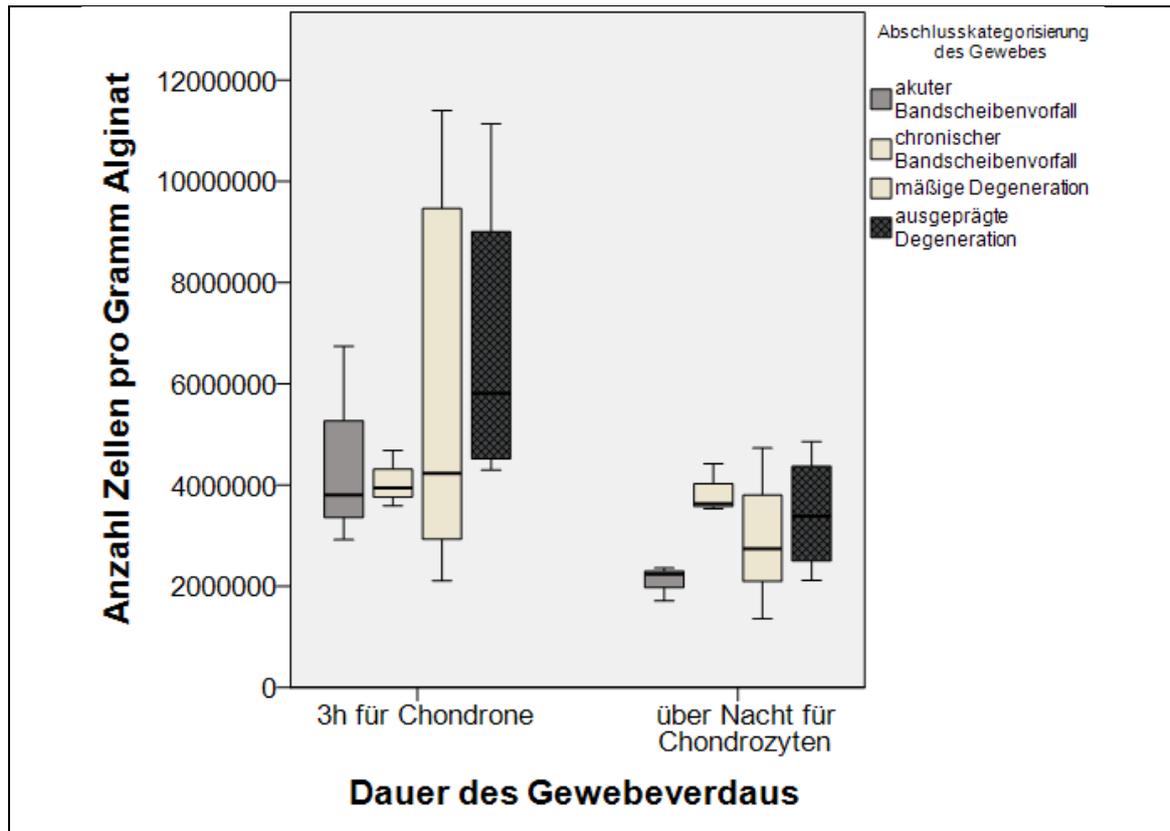
	Tag 1	Tag 7	Tag 10	Tag 13	Tag 16	Tag 19	Tag 22	Tag 25	Tag 28	Tag 31	Tag 34
Tag 1		p=0,431	p=0,999	p=0,264	p=0,052	p>0,999	<b>p=0,039</b>	<b>p=0,016</b>	<b>p=0,022</b>	<b>p=0,003</b>	p=0,092
Tag 7			p>0,999	p>0,999	p>0,999	p>0,999	p>0,999	p>0,999	p>0,999	p>0,999	p>0,999
Tag 10				p>0,999	p>0,999	p>0,999	p>0,999	p>0,999	p>0,999	p>0,999	p>0,999
Tag 13					p>0,999	p>0,999	p>0,999	p>0,999	p>0,999	p>0,999	p>0,999
Tag 16						p>0,999	p>0,999	p>0,999	p>0,999	p>0,999	p>0,999
Tag 19							p>0,999	p>0,999	p>0,999	p>0,999	p>0,999
Tag 22								p>0,999	p>0,999	p>0,999	p>0,999
Tag 25									p>0,999	p>0,999	p>0,999
Tag 28										p>0,999	p>0,999
Tag 31											p>0,999
Tag 34											

**Tabelle 14. Post-hoc-Analyse mittels Dunn–Bonferroni-Test für Chondrozyten.** Hierbei ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Auszählungszeitpunkten Tag 1 und Tag 22 ( $p=0,039$ ), Tag 1 und Tag 25 ( $p=0,016$ ), Tag 1 und Tag 28 ( $p=0,022$ ) und Tag 1 und Tag 31 ( $p=0,003$ ). Hierbei findet der Degenerationsgrad des untersuchten Gewebes keine Berücksichtigung.

Chondrone	Chondrozyten
5 543 500 ( $\pm$ 2 967 219) *	3 003 100 ( $\pm$ 1 062 609) **
<b>p = 0,001 ***</b>	

**Tabelle 15. Vergleich der Zellzahlen von Chondronen und Chondrozyten an Tag 19.** Mittelwert ( $\pm$ Standardabweichung) der Zellzahlen für Chondrone\* und Chondrozyten\*\* zum Auszählungstag 19 (Einheit: Zellen pro Gramm Alginat). Der mittels Mann-Whitney-U-Analyse ermittelte p-Wert liegt bei 0,001\*\*\*.

Die erhobene Zellanzahl für Chondrone und Chondrozyten unterscheidet sich an Tag 19 signifikant ( $p = 0,001$ ) (Tabelle 15).



**Abbildung 11. Vergleich der Zellanzahl von Chondrone und Chondrozyten in Abhängigkeit des Degenerationsgrades des Ursprungsgewebes an Tag 19.** Die Boxplots zeigen die Zellanzahl der Chondrone und Chondrozyten am Auszählungstag 19 in Abhängigkeit des Degenerationsgrades des untersuchten Gewebes. Der Ausgangswert an Tag 1 lag bei 1 000 000 Zellen pro Gramm Alginate.

Die Abschlusskategorisierung des untersuchten Gewebes berücksichtigt die Kategorisierung nach Pfirrmann und das konventionelle präoperativ angefertigte Röntgenbild. Es erfolgte eine Unterscheidung in akuter (Beschwerdedauer < 4 Wochen) oder chronischer (Beschwerdedauer > 4 Wochen) Bandscheibenvorfall, sowie in mäßige oder ausgeprägte Degeneration. Die Abschlusskategorisierung des Gewebes außer Acht lassend weisen Chondrone im Vergleich zu Chondrozyten im Allgemeinen ein größeres Zellwachstum bis zum Auszählungstag 19 auf. Die Zellanzahl liegt in etwa beim zweifachen Wert der zum Vergleich rechts im Schaubild aufgetragenen Zellanzahl der Chondrozyten. Der Ausgangswert aller ausgewerteten Kulturen lag bei 1 000 000 Zellen pro Gramm Alginate. Es wurden jeweils 3 Gewebeprobe mit akuten Bandscheibenvorfällen und chronischen Bandscheibenvorfällen, 10

Proben mit mäßiger und 4 Proben mit ausgeprägter Degeneration in die Auswertung einbezogen. Bei einer ausgeprägten Degeneration ist die größte Zunahme der Zellen, unabhängig von der Dauer des Gewebeverdaus, zu beobachten. Die aus dem Bandscheibengewebe isolierten Zellen der Patienten die unter einer akuten Bandscheibenproblematik litten weisen bis zu diesem Zeitpunkt die geringste Zunahme auf (Abbildung 11).

Das Ergebnis des durchgeführten Kruskal-Wallis-Test zeigt keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Ausprägung der Degeneration und der Zellanzahl zum Auszählungstag 19 ( $p = 0,464$  für Chondrone und  $p = 0,215$  für Chondrozyten) (Tabelle 16). Aus diesem Grund wurde auf die Durchführung einer post-hoc-Analyse verzichtet.

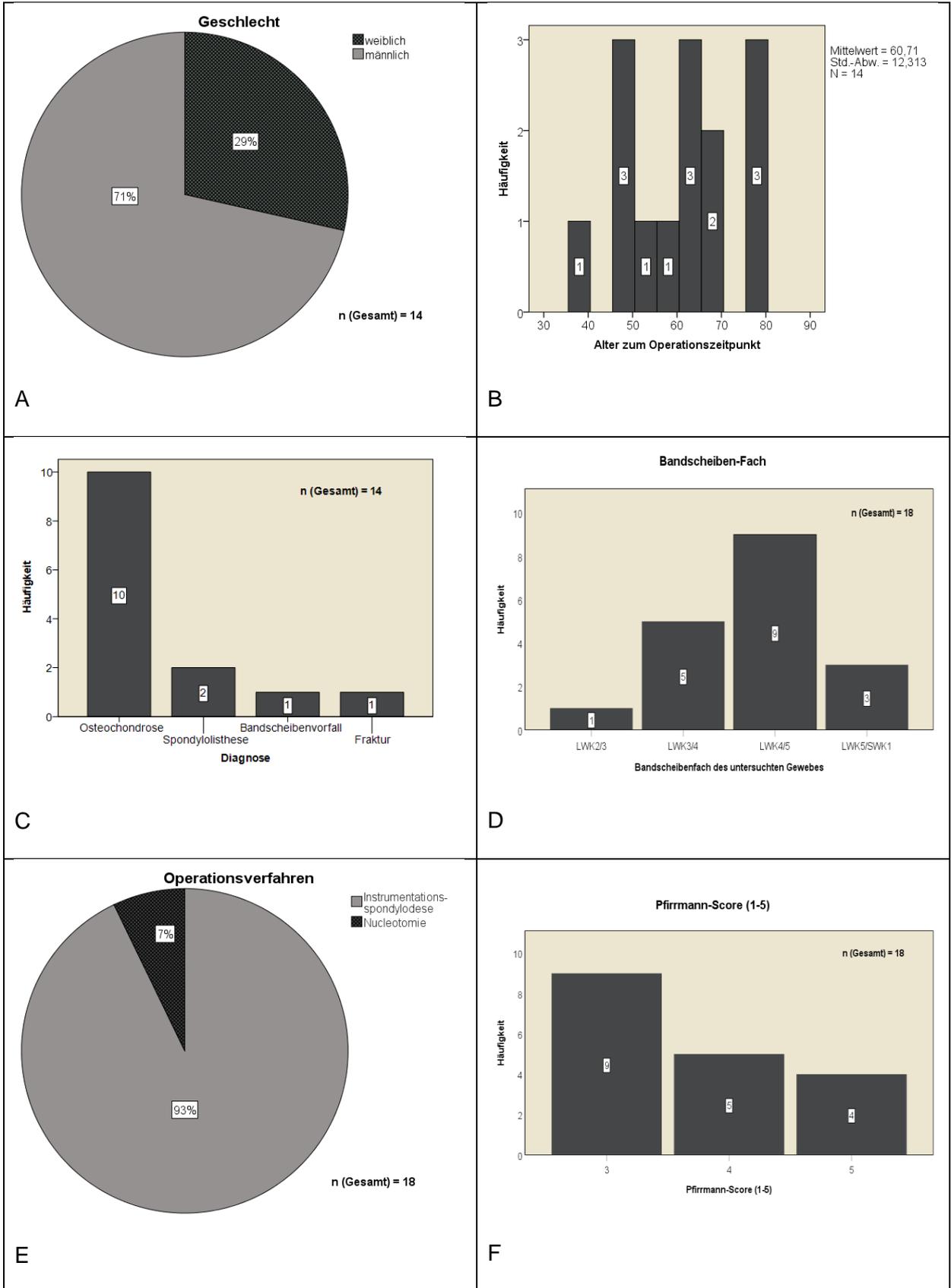
Chondrone	Chondrozyten
$p = 0,464^*$	$p = 0,215^{**}$

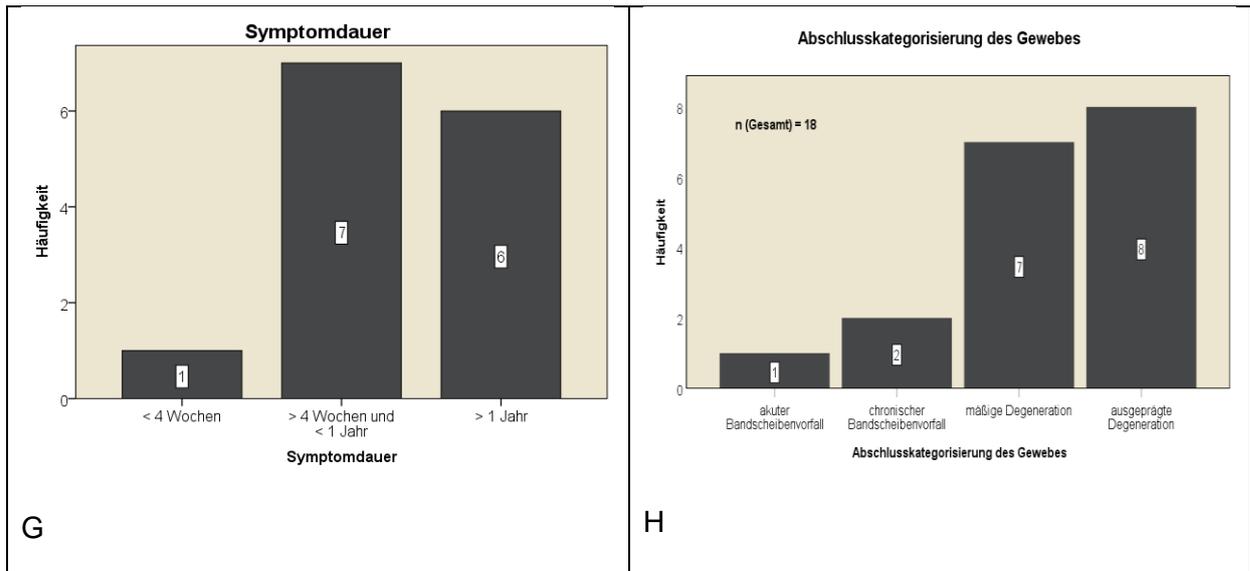
**Tabelle 16.** Kruskal-Wallis-Test zur Bestimmung der Signifikanz hinsichtlich der Ausprägung des Degenerationsgrades und der Zellzahl an Tag 19. Der ermittelte  $p$ -Wert für Chondrone liegt bei  $0,464^*$ , für Chondrozyten bei  $0,215^{**}$ . Es besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Ausprägung der Degeneration und der Zellzahl.

## 3.2 Zellularität unter medikamentösem Einfluss

### 3.2.1 Datenanalyse des untersuchten Patientenkollektivs

Die zweite Fragestellung beinhaltet die Auswirkung auf die Zellularität unter medikamentösem Einfluss. Hierfür wurden 18 Bandscheibenproben von 14 verschiedenen Patienten ausgewertet. Bei vier Patienten wurden jeweils zwei Bandscheiben in die Studie eingeschlossen. Bei allen weiteren Patienten wurde eine Bandscheibe operativ entfernt.



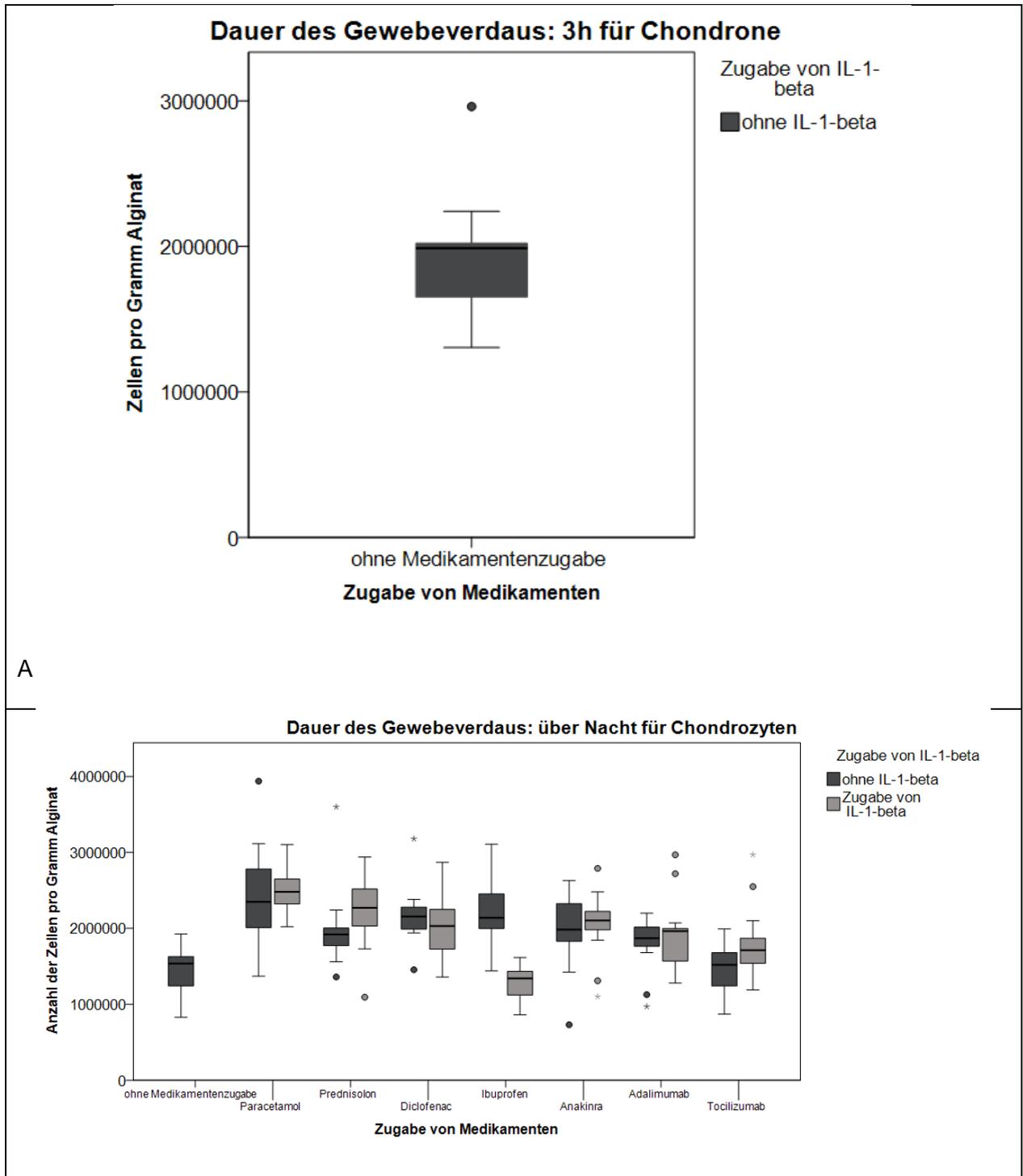


**Abbildung 12. Biometrische Daten zu den untersuchten Bandscheiben und Kategorisierung der Degeneration** (A) Das Kreisdiagramm zeigt die **Geschlechterverteilung** der eingeschlossenen Patienten. (B) Das Histogramm zeigt die Verteilung des **Alters der Patienten zum Zeitpunkt der OP**. (C) Das Balkendiagramm zeigt die gestellten **Diagnosen**, auf Grund welcher die in die Studie eingeschlossenen Patienten operiert wurden. (D) Das Balkendiagramm zeigt aus welchem **Bandscheibenfach** das untersuchte Gewebe entnommen wurde. (E) Das Kreisdiagramm verbildlicht das gewählte **Operationsverfahren**. (F) Das Balkendiagramm zeigt die qualitative **Einteilung des Bandscheibengewebes nach Pfirrmann**. (G) Das Balkendiagramm zeigt die **Symptombdauer vor OP-Beginn**. (H) Das Balkendiagramm zeigt die **Abschlusskategorisierung** der untersuchten Bandscheibenproben.

10 der untersuchten Patienten waren männlich und 4 der untersuchten Patienten waren weiblich (Abbildung 12 A). Der Median des Patientenalters zum Operationszeitpunkt liegt bei 60,7 Jahren ( $\pm 12,3$  Jahre) mit einer Altersspanne von 38 bis 78 Jahren (Abbildung 12 B). Bei 10 der 14 in die Auswertung eingeschlossenen Patienten wurde eine Osteochondrose diagnostiziert. Der Indikation für eine Operation zwei weiterer Patienten lag eine Spondylolisthese zu Grunde und jeweils ein Patient wies ein Bandscheibenvorfall oder eine Fraktur auf (Abbildung 12 C). Alle untersuchten Bandscheibenproben entstammen der Lendenwirbelsäule zwischen LWK 2/3 (1 Bandscheibenproben) und LWK 5/SWK 1 (3 Bandscheibenproben). 5 der untersuchten Bandscheibenproben entstammen dem Zwischenwirbelraum LWK 3/4 und 9 weitere Bandscheibenproben entstammen regio LWK 4/5 (Abbildung 12 D). In 93% der Operationen wurde das Bandscheibengewebe mittels Instrumentationsspondylodese gewonnen und in 7% der durchgeführten

Operationen wurde eine Nucleotomie durchgeführt (Abbildung 12 E). Die Einteilung der untersuchten Bandscheiben hinsichtlich ihrer Qualität erfolgte mittels des ordinal skalierten Pfirrmann-Scores. Die Auswertung der präoperativ angefertigten MRT-Bilder ergab bei 50% der Bandscheibenproben eine Zuordnung zu Grad 3 auf Grund des Differenzierungsverlustes zwischen Nucleus und Annulus. 5 der 18 Bandscheiben wiesen zusätzlich eine inhomogene Struktur auf (Grad 4). Bei 4 weiteren Proben fehlten die Differenzierungsmerkmale vollständig und wiesen des Weiteren eine deutlich verringerte Bandscheibenhöhe auf. Diese Proben wurden Grad 5 zugeordnet (Abbildung 12 F). Die Anzahl der durch die Patienten beschriebene präoperative Symptombdauer verteilt sich annähernd gleich auf diejenigen die zwischen 4 Wochen und einem Jahr Beschwerden aufwiesen (50%) und auf diejenigen die bereits über einem Jahr unter Schmerzen litten (43%). Lediglich ein Patient (7%) wies eine akute Symptomatik auf und berichtete über eine Beschwerdezeit von unter 4 Wochen (Abbildung 12 G). Unter Berücksichtigung der Anamnese, des Pfirrmann-Scores und des präoperativ angefertigten konventionellen Röntgenbildes erfolgte die Abschlusskategorisierung des Bandscheibengewebes. Bei 95% der entnommenen Bandscheiben lag eine chronische Symptomatik zu Grunde. Diese teilt sich auf in chronische Bandscheibenvorfälle (2 Gewebeproben), mäßige Degeneration (7 Gewebeproben) und ausgeprägte Degeneration (8 Gewebeproben). Lediglich eine Gewebeprobe wurde auf Grund eines akuten Bandscheibenvorfalles im Rahmen einer Nucleotomie entfernt (Abbildung 12 H).

## 3.2.2 Wachstumsverhalten



**Abbildung 13. Medikamentöser Einfluss und Einfluss von IL-1 $\beta$  auf die Zellularität von Chondronen und Chondrozyten.** Die Boxplots zeigen die Zellanzahl pro Gramm Alginat an Tag 19 für (A) Chondrone ohne Zugabe von Medikamenten oder IL-1 $\beta$  (A) und (B) für Chondrozyten mit und ohne Zugabe von Medikamenten sowie mit und ohne Zugabe von IL-1 $\beta$  (B).

Um die Auswirkung von Medikamenten und IL-1 $\beta$  auf das Zellteilungsverhalten der Chondrozyten zu beurteilen wurden diese isoliert, kultiviert und an Tag 19 ausgezählt. Die isolierten und in Alginatkugeln eingebetteten Zellen wurden jeweils mit der Zugabe des entsprechenden Medikamentes kultiviert. Einer weiteren Kultur wurde jeweils zusätzlich IL-1 $\beta$  zugeführt. Für jede angelegte Kultur wurde eine Kontrollkultur angelegt, der weder Medikamente noch IL-1 $\beta$  hinzugefügt wurde. Der Ausgangswert der Zellkulturen an Tag 1 betrug 1 000 000 Zellen pro Gramm Alginat.

Nach 19 Tagen konnte bei den Chondronen eine Verdopplung der Zellanzahl beobachtet werden. Der Boxplot weist auf eine linksschiefe Verteilung des zugrunde liegenden Datensatzes hin (Abbildung 13 A).

Nach 19 Tagen haben sich die Chondrozyten ohne Zugabe von Medikamenten auf etwa das 1,5-fache des Ausgangswertes erhöht (Abbildung 13 B). Die Kontrollkultur der Chondrozyten zeigt also wie aus dem ersten Versuchsabschnitt zu erwarten ein geringeres Zellwachstum auf. Alle Chondrozytenkulturen, die während der Wachstumsphase mit Medikamenten mit oder ohne Zugabe von IL-1 $\beta$  versetzt wurden zeigen ein vermehrtes Wachstum im Vergleich zur Kontrollkultur. Hierbei bilden die Kulturen *Ibuprofen + IL-1 $\beta$*  und *Tocilizumab* die einzigen Ausnahmen. Die größte Zunahme zeigen die Zellkulturen mit *Paracetamol + IL-1 $\beta$*  auf.

Auf Grund der Gesamtanzahl der Bandscheibenproben (n=18) wurde keine weitere Aufteilung hinsichtlich des Degenerationsgrades durchgeführt. Des Weiteren ergab der in Abschnitt 3.1.2 durchgeführte Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Degenerationsgrades und der Zellzahl an Tag 19 (Tabelle 17).

	Ohne Med.*	Paracetamol	Paracetamol + IL-1 $\beta$	Prednisolon	Prednisolon + IL-1 $\beta$	Diclofenac	Diclofenac + IL-1 $\beta$	Ibuprofen	Ibuprofen + IL-1 $\beta$	Anakinra	Anakinra + IL-1 $\beta$	Adalimumab	Adalimumab + IL-1 $\beta$	Tocilizumab	Tocilizumab + IL-1 $\beta$
Ohne Med.*		<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	>0,999	<b>0,009</b>	<b>0,026</b>	>0,999	<b>0,015</b>	>0,999	0,644	0,249	>0,999	>0,999	>0,999	>0,999
Paracetamol			0,449	0,005	>0,999	>0,999	>0,999	0,287	<b>&lt;0,001</b>	>0,999	>0,999	0,543	0,311	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,035</b>
Paracetamol + IL-1 $\beta$				<0,001	0,061	>0,999	0,473	0,032	<b>&lt;0,001</b>	0,842	0,009	<b>0,013</b>	<b>0,025</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
Prednisolon					>0,999	>0,999	>0,999	>0,999	0,055	>0,999	>0,999	>0,999	>0,999	>0,999	>0,999
Prednisolon + IL-1 $\beta$						>0,999	>0,999	>0,999	<b>&lt;0,001</b>	>0,999	>0,999	>0,999	>0,999	<b>&lt;0,001</b>	0,244
Diclofenac							>0,999	>0,999	<b>&lt;0,001</b>	>0,999	>0,999	>0,999	>0,999	<b>0,002</b>	0,586
Diclofenac + IL-1 $\beta$								>0,999	<b>0,007</b>	>0,999	>0,999	>0,999	>0,999	0,248	>0,999
Ibuprofen									<b>&lt;0,001</b>	>0,999	>0,999	>0,999	>0,999	<b>&lt;0,001</b>	0,385
Ibuprofen + IL-1 $\beta$										<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,174	0,095	>0,999	>0,999
Anakinra											>0,999	>0,999	>0,999	0,063	>0,999
Anakinra + IL-1 $\beta$												>0,999	>0,999	<b>0,022</b>	>0,999
Adalimumab													>0,999	>0,999	>0,999
Adalimumab + IL-1 $\beta$														>0,999	>0,999
Tocilizumab															>0,999
Tocilizumab + IL-1 $\beta$															

Tabelle 17. Kruskal-Wallis-Testung. Ohne Med\*=Kontrollgruppe

## 4 Diskussion

Zielsetzung dieser Arbeit war die Untersuchung der Wirkung von klinisch verwendeten entzündungsmodulierenden Therapeutika auf die Zellularität von Bandscheibenzellen als Funktion von perizellulärer Matrix und Degenerationsgrad und therapeutischer Modulation unter simulierten entzündlichen Bedingungen. Hierfür wurde zunächst die Auswirkung der perizellulären Matrix auf das Zellwachstum von Bandscheibenzellen in Abhängigkeit des Degenerationsgrades untersucht. Für die Durchführung wurde humanes Bandscheibengewebe verwendet, welches durch operative Behandlungsmethoden bei Patienten mit Bandscheibenvorfällen und fortgeschrittenen degenerativen Erkrankungen der Wirbelsäule entnommen wurde. Für den Einfluss der perizellulären Matrix auf das Zellwachstum wurden zunächst Zellen mit (Chondrone) und ohne perizelluläre Matrix (Chondrozyten) aus dem Bandscheibengewebe mittels zweier verschiedener Isolationsprotokolle gewonnen und in einem dreidimensionalen Wachstumsmedium (Alginat) kultiviert. Die Auszählung der Zellzahlen erfolgte zu festgelegten Zeitpunkten. Unter der Annahme eines signifikanten Unterschiedes an Auszählungstag 19 (Tabelle 15) zwischen diesen Kulturen wurden in einem zweiten Studienarm Chondrozyten bei gleichbleibendem Versuchsaufbau während der Wachstumsphase mit Medikamentenexposition kultiviert. Hierbei wurde des Weiteren der Einfluss von IL-1 $\beta$ , als proinflammatorischer Entzündungsmediator, auf die Zellularität der Chondrozyten untersucht.

Im Jahre 1988 führten Miller et al. eine Studie mit Gewebeproben von 600 obduzierten Patienten durch und untersuchten diese im Hinblick auf Zusammenhänge hinsichtlich des Patientenalters, des Geschlechts und des Wirbelsäulenfaches. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Männer in der zweiten, fünften, sechsten und siebten Lebensdekade häufiger an degenerativen Bandscheibenerkrankungen leiden als Frauen. Die größten Veränderungen waren im Bereich der LWK 3/4 und LWK 4/5 sichtbar (Miller et al., 1988). Das in der hier vorliegenden Studie untersuchte Patientenkollektiv

besteht sowohl im ersten, als auch im zweiten Studienabschnitt überwiegend aus männlichen Patienten im Alter zwischen 40 und 75 Jahren. Das intraoperativ entnommene Gewebe entstammt in den meisten Fällen den Bereichen der LWK 3/4 und LWK 4/5 und bildet somit eine repräsentative Stichprobe.

#### **4.1 Die perizelluläre Matrix hat einen Einfluss auf die Zellularität der Bandscheibenzellen**

Zur Ergebniserzielung in dieser Arbeit wurden, unabhängig vom Degenerationsgrad des Ursprungsgewebes, dreidimensionale Zellkulturen angelegt, um den Phänotyp der Chondrozyten beibehalten zu können. Hierbei wurden jeweils sowohl Chondrone als auch Chondrozyten derselben Gewebeprobe über einen Zeitraum von 34 Tagen kultiviert. Um das Wachstum der Zellen vergleichen zu können wurden die Zellen auf einen definierten Ausgangswert standardisiert.

Die im Jahre 2010 durchgeführte Studie von Vonk et al. hatte die Auswirkung der perizellulären Matrix auf die metabolische Zellaktivität der Bandscheibenzellen (Chondrone und Chondrozyten) von Ziegen gezeigt. Die dreidimensionale Wachstumskultur (Alginatekugeln) stellte sicher, dass die perizelluläre Matrix und der Chondrozytenphänotyp erhalten bleibt. Mittels Immunfärbung konnte gezeigt werden, dass sich das in der perizellulären Matrix befindliche Kollagen Typ VI nach Kultivierung in einer dreidimensionalen Kultur vor allem in der Nähe der Chondrone befand. Des Weiteren konnte durch die Färbung gezeigt werden, dass Chondrone ihre Kapsel nicht verlassen und somit die für die Zellaktivität wichtigen Bestandteile der perizellulären Matrix erhalten bleiben (Vonk et al., 2010). Der Verlauf der Wachstumskurven der Chondrone und Chondrozyten in dieser Arbeit spiegelt diese Annahme wieder (Abbildung 9). Zellen die ihre perizelluläre Matrix besitzen (Chondrone) zeigen im Allgemeinen ein vermehrtes Wachstum gegenüber Zellen ohne perizelluläre Matrix (Chondrozyten). Zu Beginn der Kultivierung sind nur geringe Unterschiede zu beobachten. Möglicherweise stellen die durchgeführte Isolierung der Zellen

und die für das Anlegen der 3-D-Kultur verwendeten Lösungen eine Belastung für die Zellen und ihre umgebende Kapsel dar. Die größte Diskrepanz zwischen den beiden angelegten Kulturen ist nach 19 Tagen zu beobachten. Hier konnte mittels Mann-Whitney-U-Analyse ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p = 0,001$ ) (Tabelle 15). Werden die Zellen über diesen Zeitraum hinaus kultiviert werden die Unterschiede wieder geringer und letztlich übersteigt das Zellwachstum der Chondrozyten das der Chondrone.

## **4.2 Der Degenerationsgrad des Ursprungsgewebes hat keinen Einfluss auf die Zellularität der Bandscheibenzellen**

Wie bereits in der Literatur beschrieben verfügen Bandscheibenzellen über ein geringes Regenerationspotential (Vonk et al., 2010). Auf molekularer Ebene ist eine herabgesetzte Transkriptionsleistung und Synthesekapazität der Zellen zu beobachten die unter anderem zu einer Veränderung der Zusammensetzung und Konzentration der extrazellulären Matrix führt (Heyde, 2006). Des Weiteren ist bereits bekannt, dass der Degenerationsgrad Auswirkungen auf die Zellorganisation im Bandscheibengewebe hat. Hierbei kommt es auf Grund von Proliferation bei zunehmender Degeneration des Gewebes zur Zellanhäufung (Cluster-Bildung). Bandscheibenzellen, die sich in diesem Zellverband befinden, haben eine nur noch schwach ausgeprägte PCM (Hofmann et al., 2018) . Insofern wurde vorgeschlagen, dass eventuell die PCM auch als Marker für den Grad der Degeneration angesehen werden kann (Steidle, 2016). Unter der Prämisse, dass die Unversehrtheit der Bandscheibenzellen und ihrer sie umgebenden Kapsel sich auf die Zellaktivität auswirken, wäre zu erwarten, dass sich das Wachstumsverhalten der Chondrone, gewonnen aus über einen längeren Zeitraum geschädigtes Gewebe (mäßige und ausgeprägte Degeneration, chronischer Bandscheibenvorfall), von dem aus weniger lang geschädigtem Gewebe (akuter Bandscheibenvorfall) unterscheidet. Analysiert man die Zellzahlen an Tag 19 unter Berücksichtigung des Degenerationsgrades der Gewebeproben zeigt sich auch hier ein insgesamt vermehrtes Wachstum

bei den Chondronen gegenüber den Chondrozyten. Der mittels Kruskal-Wallis-Testung analysierte Wert für Chondrone ( $p=0,464$ ) und für Chondrozyten ( $p=0,215$ ) ergibt jedoch keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Zellularität und Degenerationsgrad.

In der Theorie wäre in diesem Zusammenhang das Wachstumsverhalten von Zellen aus Traumagewebe interessant. Hierbei unterliegen die Zellen zwar auch den altersbedingten Degenerationsprozessen, jedoch fehlen die zusätzlich durch pathologisch degenerative Prozesse oder akuten Entzündungsreaktionen hervorgerufenen Veränderungen. Miller et al. beschreiben in einer von ihnen zitierten Studie, dass bei 90% der radiologisch untersuchten Bandscheiben der Patienten im Alter zwischen 50 und 59 Jahren degenerative Veränderungen sichtbar waren, jedoch nur 53% der Patienten je über Rückenschmerzen klagten (Miller et al., 1988). Über den Zeitraum der Studie wurde in der Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen kein Bandscheibengewebe auf Grund eines Wirbelsäulentraumas entfernt, welches für einen solchen Versuchsaufbau zur Verfügung gestanden hätte.

Eine mögliche Erklärung für das im Verhältnis geringe Zellwachstum bei Bandscheibengewebe aus akuten und chronischen Bandscheibenvorfällen ist zum einen die Tatsache, dass bei dem hier vorgenommenen Eingriff (Nucleotomie) lediglich Anteile des Nucleus pulposus entfernt werden. Das regenerative Potential des gallertartigen Kerns ist, auf Grund der bei der Protrusion oder Sequesterbildung freigesetzten Entzündungsmediatoren, welche zu einer Degeneration der extrazellulären Matrix führt, herabgesetzt (Heyde, 2006). Darüber hinaus werden in der Literatur bereits die herabgesetzte Zellteilungsrate und verkürzte Lebenszeit von Zellen des Nucleus pulposus bei in vitro Versuchen beschrieben (Richardson et al., 2007). Des Weiteren wurden die untersuchten Gewebeproben in fünf Kategorien eingeteilt. Es ist nicht auszuschließen, dass eine weniger detaillierte Einteilung und eine Erhöhung der Fallzahl das Ergebnis beeinflusst hätten.

### 4.3 Die Rolle antiphlogistischer Therapeutika auf die Zellularität von Chondrozyten

Die Schmerzausschaltung bei einem vorliegenden Lumbalsyndrom erfolgt bei der symptomatischen Therapie nach dem WHO-Stufenschema (Abbildung 4).

Für den folgenden Versuchsaufbau (Abbildung 7) wurden lediglich Chondrozyten kultiviert. Die Zellkulturen wurden mit den entsprechenden Medikamenten versehen. Zusätzlich erhielt jeweils eine der Kulturen IL-1 $\beta$ . Der Entscheidung für die Kultivierung in Form von Chondrozyten liegt die Tatsache zu Grunde, dass die Qualität der PCM, wie oben beschrieben, in Zusammenhang mit dem Degenerationsgrad steht. Laut Roberts et al. ist die PCM im Bereich des Nucleus pulposus besonders gut sichtbar (Roberts et al., 1991). Es gibt jedoch auch Hinweise in der Literatur, dass die PCM auch im Bereich des Annulus fibrosus gut sichtbar ist (Hofmann et al., 2018). Auf eine Unterteilung hinsichtlich des Degenerationsgrades wurde auf Grund der geringen Fallzahl verzichtet. Eine zusätzliche Chondronen-Kultur wurde zwar angelegt (jedoch ohne weitere Zugabe von Medikamenten oder IL-1 $\beta$ ) und zeigt lediglich das Wachstumsverhalten im Vergleich zur Chondrozyten-Kontrollkultur (Abbildung 13 A). Sie wird im Folgenden nicht weiter erwähnt, da der Einfluss der perizellulären Matrix auf das Wachstumsverhalten bereits ausführlich besprochen wurde.

Gegenüber der Kontrollkultur, welche keine Medikamentenzugabe erhielt, wiesen die Mehrzahl der angelegten Chondrozytenkulturen, unabhängig von der Wahl des zugegebenen Medikamentes sowie der optionalen Zugabe von IL-1 $\beta$ , in der aktuellen Studie ein vermehrtes Zellwachstum auf (Auszählungszeitpunkt Tag 19), teilweise mit statistisch signifikanten Unterschieden. Die einzigen Ausnahmen bilden hierbei die Kulturen *Ibuprofen + IL-1 $\beta$*  und *Tocilizumab*.

Es ergibt sich, wie in Tabelle 17 ersichtlich, ein signifikanter Unterschied zwischen der Kultur *Paracetamol* und der *Kontrollgruppe* ( $p < 0,001$ ). Die Wirkung von Paracetamol als antiphlogistisches symptomatisches Therapeutikum muss jedoch kritisch betrachtet werden. Der Wirkstoff reichert

sich nicht direkt in Entzündungsgebieten an sondern verteilt sich gleichmäßig im Organismus und wird nach Passage der Blut-Hirn-Schranke hauptsächlich im zentralen Nervensystem wirksam (Laufer et al., 2002). Zu erwarten wären eigentlich annähernd ähnliche Werte wie bei der Kontrollgruppe.

Es ist kritisch zu bewerten ob die im Versuchsaufbau verwendete Dosis an Medikamenten einer tatsächlich am Wirkungsort ankommenden Dosis in vivo entspricht. Zur Orientierung für die zugegebene Medikamentendosis diene die mittels roter Liste ermittelte maximale Plasmakonzentration ( $C_{max}$ ). Einige Patienten erhielten, laut Patientenakte, präoperativ bereits eine antiphlogistische Therapie laut WHO-Stufenschema. Nicht bekannt ist welche Medikamente im Sinne einer „Selbstmedikation“ zugeführt wurden. Die präoperative Medikation wurde bei der vorliegenden Studie nicht berücksichtigt.

#### **4.4 Der Effekt von IL-1 $\beta$ auf die Zellularität unter medikamentöser antiphlogistischer Exposition**

Bei den degenerativen Prozessen unterliegen die Bandscheibenzellen veränderten extrazellulären Bedingungen. Hierzu zählen Entzündungsmediatoren (IL-1, TNF $\alpha$ , PGE $_2$ ), Zellabbauprodukte (Fragmente von Kollagen, Aggrecan und Fibronectin) sowie mechanische Belastung (Joos, 2009). Interleukine sind körpereigene Botenstoffe des Immunsystems. IL-1 $\beta$  kann in gesunden Zellen nicht nachgewiesen werden und fungiert als entzündungsfördernder Mediator. Das Peptidhormon wirkt über den auf nahezu allen Zelloberflächen vorkommenden IL-1-Rezeptor (IL-1-R). Des Weiteren triggert IL-1 $\beta$  über den auf Endothelzelloberflächen vorkommenden IL-1-R die Transduktion von Cyclooxygenase 2 (COX2) und induziert damit eine vermehrte Bildung von Prostaglandin E $_2$  (PGE $_2$ ). IL-1 $\beta$  induziert die Bildung von Stickstoffmonoxid. Daraus resultiert ein vermehrter Zelltod (Joos, 2009). Somit wäre zu erwarten, dass alle Kulturen deren Medikamente über die IL-1 $\beta$ -Inaktivierung, über die Inaktivierung des IL-1-Rezeptors oder denjenigen Entzündungsmediatoren welche in der sich hieraus entwickelnden Kaskade

wirken, ein vermehrtes Zellwachstum bzw. eine verminderte Zelltodrate aufweisen.

Die aus dem intraoperativ gewonnenen Bandscheibengewebe isolierten Chondrozyten befinden sich nicht in ihrer natürlichen Umgebung. Eine Entzündungsreaktion kann auf Grund des vollständigen Fehlens von ortsansässigen Zellen (Monozyten/Makrophagen und dendritische Zellen) nicht stattfinden. IL-1 $\beta$  wurde als proinflammatorischer Entzündungsmediator direkt hinzugegeben, da eine ausschließlich zelleigene Bildung der Chondrozyten nicht gewährleistet werden kann und die Entstehung der Entzündungskaskade somit sicher gestellt werden konnte.

In der aktuellen Studie ist im Allgemeinen ein vermehrtes Wachstum der Zellen bei Zugabe von IL-1 $\beta$  zu beobachten. Die Ausnahmen stellen hierbei *Ibuprofen* und *Diclofenac* dar (Abbildung 13B). Es ergibt sich ein signifikanter Wert zwischen *Ibuprofen* und *Ibuprofen + IL-1 $\beta$*  ( $p < 0,001$ ). *Ibuprofen* und *Diclofenac* wirken als nichtsteroidale Entzündungshemmer über die nichtselektive Hemmung der Cyclooxygenase 1 und 2 (COX1 und 2) und verhindern im weiteren die Bildung und Freisetzung von entzündungsvermittelnden Prostaglandinen (PGE<sub>2</sub>) und Schmerzsignalen (Joos, 2009). Joos konnte 2009 zeigen, dass die Kultivierung von Knorpelzellen mit 10ng/ml IL-1 $\beta$  (das entspricht auch der hier verwendeten Dosis) bereits nach 4 Stunden eine Erhöhung der COX2-Expression um den Faktor 30 und eine um das 6-fache erhöhte Freisetzung von PGE<sub>2</sub> bedingt. Dies erklärt möglicherweise das verminderte Zellwachstum der Kultur *Ibuprofen* und *Diclofenac* unter Zugabe von IL-1 $\beta$ . Anzunehmen wäre, dass die Zellkulturen unter Zugabe von *Ibuprofen* und *Diclofenac*, auf Grund ihrer ähnlichen Wirkungsweise, ein ähnliches Wachstumsverhalten aufweisen. Jedoch zeigten Smith et al. bereits im Jahre 1995, dass humane Knorpelzellen eine unterschiedliche Reaktion auf NSAIDs (in der vorliegenden Studie handelte es sich unter anderem um Naproxen, *Ibuprofen* und *Diclofenac*) aufweisen. Auch wenn sich der Versuchsaufbau zu dem hier durchgeführten unterscheidet (humane Knorpelzellen des Kniegelenks, Entnahme bei Autopsie 12-18 Stunden post mortem, Monolayerkultur mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>) konnte gezeigt

werden, dass Ibuprofen bei einer Konzentration von 100µg/ml, als einziges der getesteten Medikamente, die Zellproliferation signifikant hemmt ( $p < 0,05$ ). Auch bei niedrigerer Dosierung lagen die Werte unterhalb derer der Kontrollgruppe. Bei einer mit unserem Versuchsaufbau vergleichbaren Diclofenac-Konzentration zeigte sich eine gegenüber der Kontrollgruppe erhöhte Zellproliferation (Smith et al., 1995).

Das hier verwendete Glucocorticoid Prednisolon wirkt über die Inaktivierung von IL-1 und TNF- $\alpha$ . Abbildung 13B zeigt eine erhöhte Zellzahl (*Prednisolon + IL-1 $\beta$* ) gegenüber den meisten anderen Kulturen (einzige Ausnahme ist *Paracatamol*). Mittels Kruskal-Wallis-Testung (Tabelle 17) lassen sich signifikante Werte zwischen *Prednisolon + IL-1 $\beta$*  und der *Kontrollgruppe* ( $p = 0,009$ ), *Ibuprofen + IL-1 $\beta$*  ( $p = 0,001$ ) und *Tocilizumab* ( $p = 0,001$ ) bestimmen.

Die in der vorliegenden Studie verwendeten so genannten Biologicals stellen Zytokininhibitoren dar, deren Wirksamkeit bei chronisch entzündlichen Erkrankungen in klinischen Studien bereits bewiesen werden konnte (Antoni and Manger, 2004). Anakinra ist ein gentechnisch hergestellter IL-1-R-Antagonist und wirkt über die kompetitive Verdrängung von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  von den Rezeptoren. Hierdurch wird die nachfolgende Entzündungsreaktion unterbrochen. Es besteht eine Signifikanz zwischen *Anakinra* und *Ibuprofen + IL-1 $\beta$*  ( $p < 0,001$ ) und zwischen *Anakinra + IL-1 $\beta$*  und *Ibuprofen + IL-1 $\beta$*  ( $p < 0,001$ ). Smith et al. zeigten in ihrer Studie im Jahre 1995, dass die durch IL-1 induzierte IL-6-Bildung bei Zugabe von IL-1 $\beta$  ( $2 \times 10^6$  IU/mg) zu normalen humanen Chondrozyten um das 218-fache ansteigt (Smith et al., 1995). Tocilizumab wirkt als IL-6-Rezeptor-Antagonist. Einen signifikanten Unterschied im Hinblick auf das Wachstumsverhalten zwischen *Tocilizumab* und *Tocilizumab + IL-1 $\beta$*  konnte nicht beobachtet werden. Hierbei muss erwähnt werden, dass IL-6 von Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen gebildet werden kann, IL-6-Rezeptoren jedoch nur auf wenigen Zelloberflächen vorkommen. Hierzu zählen Leberzellen und Leukozyten (Köhne, 2004). Ein ausbleibender Effekt liegt möglicherweise in dem hier stark vereinfachten Versuchsaufbau begründet.

## 5 Zusammenfassung

74%-85% aller in Deutschland lebenden Menschen leiden mindestens einmal in ihrem Leben an Rückenschmerzen. Hierbei sind etwa 40% auf degenerative Bandscheibenerkrankungen zurückzuführen (Raspe), wenngleich degenerative Veränderungen häufig altersbedingt und ohne Krankheitswert sind. Degenerative Veränderungen finden sich, lt. einer Studie aus dem Jahre 1988 von Miller et al., bei Männern in der zweiten, fünften und sechsten Lebensdekade im Bereich der LWK3/4 und LWK4/5 (Miller et al., 1988). Die degenerativen Veränderungen des makromolekularen Milieus bedingen eine Veränderung in der Umwandlung der biochemischen und biomechanischen Signale der Bandscheibenzellen (Heyde, 2006). Die perizelluläre Matrix, als Bestandteil der extrazellulären Matrix, scheint hierbei eine bedeutende Rolle in Bezug auf die Regulation der Zellaktivität zu spielen (Wilusz et al., 2014). Der Erhalt der perizellulären Matrix und des Chondrozytenphänotyps kann, in vitro, mittels dreidimensionalem Wachstumsmedium gesichert werden (Vonk et al., 2010). Das Therapiespektrum bei Rückenschmerzen auf Grund degenerativer Veränderungen umfasst Physiotherapie, medikamentöse Therapieansätze (diese richten sich nach dem WHO-Stufenschema), sowie operative Behandlungsmethoden.

In dieser Arbeit wurden humane Bandscheibenzellen, aus intraoperativ gewonnenem degeneriertem Bandscheibengewebe isoliert und in einem dreidimensionalen Wachstumsmedium (Alginate) kultiviert. Das Patientenkollektiv bildet eine repräsentative Stichprobe zur der oben genannten Studie von Miller et al.. Zellen im Besitz ihrer perizellulären Matrix (Chondrone) zeigen, unabhängig vom vorliegenden Degenerationsgrad des Gewebes, signifikant eine vermehrte Zunahme der Zellanzahl in einer definierten Zeiteinheit gegenüber Zellen, die ihre extrazelluläre Matrix verloren haben (Chondrozyten) ( $p=0,003$ ). Zielsetzung im zweiten Studienabschnitt war die Untersuchung klinisch verwendeter entzündungsmodulierender Therapeutika unter Simulation einer entzündlichen Umgebung durch IL-1 $\beta$ . Die Untersuchungen ergaben, dass nach 19 Tagen bei der Mehrzahl der

angelegten Kulturen, unabhängig vom zugegebenen Medikament, eine, teilweise signifikante, Zunahme der Zellanzahl gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden konnte. Eine Zugabe von IL-1 $\beta$  führte bei den meisten Kulturen zu einer Zunahme der Zellanzahl.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

### 6.1 Abkürzungen

ALIF	Anterior Lumbar Interbody Fusion
BWK	Brustwirbelkörper
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
C <sub>max</sub>	Maximale Plasmakonzentration
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure (Desoxiribonuclein acid)
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
ECM	Extrazellulärmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Ethylendiamintetraacetat)
Et al.	Unter anderem
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
GAG	Glycosaminoglycan
HWK	Halswirbelsäule
IL	Interleukin
IL-1-R	Interleukin-1-Rezeptor
Kat.Nr.	Katalognummer
MAC	Membranangriffskomplex (membrane attack complex)
Med.	Medikament
MRT	Magnetresonanztomographie
Na <sup>+</sup>	Natrium

NaCl	Natriumchlorid
OLIF	Oblique Lumbar Interbody Fusion
OP	Operation; Operationssaal
PCM	Perizelluläre Matrix
Pen/Strep	Penicillin / Streptomycin
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PLIF	Posterior Lumbar Interbody Fusion
SWK	Sakralwirbelkörper
TLIF	Transforaminal Lumbar Interbody Fusion
TNF	Tumornekrosefaktor
UV	Ultra Violett
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation)
XLIF	Extreme Lumbar Interbody Fusion

## 6.2 Einheiten- und Größenordnungen

°	Grad
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
g	Gramm
G	Gauge
kDa	Kilodalton
mean	Durchschnitt

---

mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
N	Anzahl
ng	Nanogramm
Nm	Nanometer
Std-Abw.	Standartabweichung
Std. Dev.	Standartabweichung (standard deviation)
U/min	Umdrehungen/Minute

## 7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abbildung 1. Aufbau der Wirbelsäule und der Wirbelsäulensegmente.** Aufbau der Wirbelsäule von vorne und von der Seite (A). Aufbau der Wirbelsäulensegmente mit angrenzenden anatomischen Strukturen (B). (Bühren and Josten, 2013). Abbildung aus „Die Chirurgie der verletzten Wirbelsäule“ Springer Verlag mit Erlaubnis.....**6**
- Abbildung 2. Aufbau der humanen Bandscheibe.** Die humane Bandscheibe unterteilt sich in einen innenliegenden gallertartigen Kern (Nucleus pulposus) sowie in den äußeren Faserring (Anulus fibrosus). Abbildung Prometheus LernAtlas – Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem (Thieme) mit Erlaubnis.....**8**
- Abbildung 3. Aufbau der extrazellulären Matrix.** Die Grafik zeigt die schematische Anordnung der extrazellulären Matrix und ihrer Bestandteile. Modifizierter Teil der Abbildung A aus „Osteoarthritis in the human knee: a dynamic process of cartilage matrix degradation, synthesis and reorganization. in Joint Destruction in Arthritis and Osteoarthritis“ (Poole et al., 1993) gefunden auf [www.tecomedical.com](http://www.tecomedical.com) mit Erlaubnis....**11**
- Abbildung 4. WHO-Stufenschema.** Das Schaubild zeigt die laut Weltgesundheitsorganisation empfohlenen Richtlinien zur Verabreichungshierarchie von Schmerzmitteln.....**21**
- Abbildung 5. Bandscheibenzellen bei 20-facher Vergrößerung unter einem Lichtmikroskop.** Fibroblastenartige Zellen durch Kultivierung in einer Monolayerkultur (A). Chondron (schwarze Pfeile) in 3-D-Kultivierung der Bandscheibenzellen in Alginat (B).....**34**
- Abbildung 6. Schematische Darstellung der Strukturformel von Alginat (vereinfacht).** Alginat liegt als Polysaccharid vor (A). Vernetzung der Polymerstränge durch eine Ionenaustauschreaktion von Na<sup>+</sup>-Ionen und Ca<sup>2+</sup>-Ionen bei Kontakt des Alginates mit einer Calciumchloridlösung.....**35**
- Abbildung 7. Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.** Aus jeder Bandscheibenprobe wurden Chondrozyten und Chondrone (optional) isoliert. Die Chondrozytenkulturen erhielten neben ihrem Nährmedium eine Medikamentenzugabe. Jedes Medikament wurde ebenfalls in einem zusätzlichen Experiment unter Zugabe von IL-1 $\beta$  angewendet. Die Kontrollgruppe der Chondrozyten erhielt weder eine Medikamentenzugabe noch IL-1 $\beta$ . Bei zusätzlicher Isolierung von Chondronen wurden diese ausschließlich in Nährmedium kultiviert.....**38**
- Abbildung 8. Biometrische Daten zu den untersuchten Bandscheiben und Kategorisierung der Degeneration** (A) Das Kreisdiagramm zeigt die Geschlechterverteilung der eingeschlossenen Patienten. (B) Das Histogramm zeigt die Verteilung des Alters der Patienten zum Zeitpunkt der OP. (C) Das Balkendiagramm zeigt die gestellten Diagnosen, auf Grund welcher die in die Studie eingeschlossenen Patienten operiert wurden. (D) Das Balkendiagramm zeigt aus welchem Bandscheibenfach das untersuchte Gewebe entnommen wurde. (E) Das Kreisdiagramm verbildlicht das gewählte Operationsverfahren. 75% der ausgewerteten Bandscheiben wurden durch eine lumbale Fusion gewonnen. (F) Das Balkendiagramm zeigt die qualitative Einteilung des Bandscheibengewebes nach Pfirrmann. (G) Das Balkendiagramm zeigt die annähernd gleichverteilte Symptombdauer vor OP-Beginn. (H) Das Balkendiagramm zeigt die Abschlusskategorisierung der untersuchten Bandscheibenproben. Der Fokus der Gewebeproben liegt auf degeneriertem Bandscheibengewebe.....**42**
- Abbildung 9. Veränderungen der Zellanzahl von Chondronen und Chondrozyten.** Der Boxplot zeigt die Zellanzahl der Chondrone und Chondrozyten zu den unterschiedlichen Auszählungszeitpunkten. Der Ausgangswert für alle Kulturen lag bei 1 000 000 Zellen pro Gramm Alginat. Die größte Diskrepanz hinsichtlich der Zellanzahl zwischen den beiden Studienarmen besteht an Tag 19.....**44**

<b>Abbildung 10. Häufigkeitsverteilung der Zellanzahl an Tag 7 und an Tag 19 für Chondrone und Chondrozyten.</b> Die Häufigkeitsverteilung der Zellanzahl an Tag 7 der Chondrone (A) und Chondrozyten (B) ist grenzwertig normalverteilt. Die Häufigkeitsverteilung der Zellanzahl an Tag 19 für Chondrone (C) und Chondrozyten (D) zeigt keine Normalverteilung. Der Degenerationsgrad der untersuchten Gewebeproben findet keine Berücksichtigung.....	<b>45</b>
<b>Abbildung 11. Vergleich der Zellanzahl von Chondrone und Chondrozyten in Abhängigkeit des Degenerationsgrades des Ursprungsgewebes an Tag 19.</b> Die Boxplots zeigen die Zellanzahl der Chondrone und Chondrozyten am Auszählungstag 19 in Abhängigkeit des Degenerationsgrades des untersuchten Gewebes. Der Ausgangswert an Tag 1 lag bei 1 000 000 Zellen pro Gramm Alginat.....	<b>49</b>
<b>Abbildung 12. Biometrische Daten zu den untersuchten Bandscheiben und Kategorisierung der Degeneration</b> (A) Das Kreisdiagramm zeigt die Geschlechterverteilung der eingeschlossenen Patienten. (B) Das Histogramm zeigt die Verteilung des Alters der Patienten zum Zeitpunkt der OP. (C) Das Balkendiagramm zeigt die gestellten Diagnosen, auf Grund welcher die in die Studie eingeschlossenen Patienten operiert wurden. (D) Das Balkendiagramm zeigt aus welchem Bandscheibenfach das untersuchte Gewebe entnommen wurde. (E) Das Kreisdiagramm verbildlicht das gewählte Operationsverfahren. (F) Das Balkendiagramm zeigt die qualitative Einteilung des Bandscheibengewebes nach Pfirrmann. (G) Das Balkendiagramm zeigt die Symptombdauer vor OP-Beginn. (H) Das Balkendiagramm zeigt die Abschlusskategorisierung der untersuchten Bandscheibenproben.....	<b>52</b>
<b>Abbildung 13. Medikamentöser Einfluss und Einfluss von IL-1<math>\beta</math> auf die Zellularität von Chondronen und Chondrozyten.</b> Die Boxplots zeigen die Zellanzahl pro Gramm Alginat an Tag 19 für (A) Chondrone ohne Zugabe von Medikamenten oder IL-1 $\beta$ (A) und (B) für Chondrozyten mit und ohne Zugabe von Medikamenten sowie mit und ohne Zugabe von IL-1 $\beta$ (B).....	<b>54</b>
<b>Tabelle 1. Übersicht der verwendeten Chemikalien</b> .....	<b>25</b>
<b>Tabelle 2. Übersicht der verwendeten Zellkulturmedien und Puffer</b> .....	<b>26</b>
<b>Tabelle 3. Übersicht der verwendeten Enzyme und Proteine</b> .....	<b>26</b>
<b>Tabelle 4. Übersicht der verwendeten Medikamente</b> .....	<b>27</b>
<b>Tabelle 5. Übersicht der für die Zellkultur verwendeten Lösungen</b> .....	<b>27</b>
<b>Tabelle 6. Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien</b> .....	<b>28</b>
<b>Tabelle 7. Übersicht der verwendeten Geräte</b> .....	<b>29</b>
<b>Tabelle 8. Übersicht der verwendeten Software</b> .....	<b>30</b>
<b>Tabelle 9. Einteilungskriterien der Gewebeproben</b> .....	<b>31</b>
<b>Tabelle 10. Übersicht Gewebeverdauer</b> .....	<b>32</b>
<b>Tabelle 11. Übersicht der verwendeten Medikamentendosen</b> .....	<b>37</b>
<b>Tabelle 12. Friedman-Test.</b> Es ergeben sich jeweils signifikante Unterschiede innerhalb der Wachstumskurven für die zu den an den jeweiligen Auszählungstagen ermittelten Zellzahlen der Chondrone ( $p=0,003$ ) und Chondrozyten ( $p=0,003$ ).....	<b>46</b>
<b>Tabelle 13. Post-hoc-Analyse mittels Dunn-Bonferroni-Test für Chondrone.</b> Hierbei ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Auszählungszeitpunkten Tag 1 und Tag 13 ( $p=0,022$ ), Tag 1 und Tag 16 ( $p=0,008$ ), Tag 1 und Tag 19 ( $p=0,006$ ), Tag 1 und Tag 22 ( $p=0,016$ ), Tag 1 und Tag 25 ( $p=0,045$ ) und Tag 1 und Tag 31 ( $p=0,022$ ). Hierbei findet der Degenerationsgrad des untersuchten Gewebes keine Berücksichtigung.....	<b>47</b>
<b>Tabelle 14. Post-hoc-Analyse mittels Dunn-Bonferroni-Test für Chondrozyten.</b> Hierbei ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Auszählungszeitpunkten Tag 1 und Tag 22 ( $p=0,039$ ), Tag 1 und Tag 25 ( $p=0,016$ ), Tag 1 und	

Tag 28 ( $p=0,022$ ) und Tag 1 und Tag 31 ( $p=0,003$ ). Hierbei findet der Degenerationsgrad des untersuchten Gewebes keine Berücksichtigung. ....48

**Tabelle 15. Vergleich der Zellzahlen von Chondronen und Chondrozyten an Tag 19.** Mittelwert ( $\pm$ Standardabweichung) der Zellzahlen für Chondrone\* und Chondrozyten\*\* zum Auszählungstag 19 (Einheit: Zellen pro Gramm Alginat). Der mittels Mann-Whitney-U-Analyse ermittelte p-Wert liegt bei 0,001\*\*\* .....48

**Tabelle 16. Kruskal-Wallis-Test zur Bestimmung der Signifikanz hinsichtlich der Ausprägung des Degenerationsgrades und der Zellzahl an Tag 19.** Der ermittelte p-Wert für Chondrone liegt bei 0,464\*, für Chondrozyten bei 0,215\*\*. Es besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Ausprägung der Degeneration und der Zellzahl. ....50

**Tabelle 17. Kruskal-Wallis-Testung.....56**

## 8 Firmenverzeichnis

Firma	Adresse
AbbVie GmbH&Ko.KG	Mainzer Str. 81, 65189 Wiesbaden <a href="http://www.abbvie.de">www.abbvie.de</a>
Aesculap AG	Am- Aesculap-Platz, 78532 Tuttlingen <a href="http://www.bbraun.de">www.bbraun.de</a>
BD Deutschland	Tullastr. 8-12, 69126 Heidelberg <a href="http://www.bd.com/de-de">www.bd.com/de-de</a>
BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH	Pfullinger Straße 57, 72820 Sonnenbühl- Genkingen <a href="http://www.bdk-online.de">www.bdk-online.de</a>
Binder GmbH	Im Mittleren Ösch 5, 78532 Tuttlingen <a href="http://www.binder-world.com/de">www.binder-world.com/de</a>
Biochrome GmbH	Leonorenstr. 2-6, 12247 Berlin <a href="http://www.biochrom.de">www.biochrom.de</a>
Biozym Scientific GmbH	Steinbrinksweg 27, 31840 Hessisch Oldenburg

	<a href="http://www.biozym.com">www.biozym.com</a>
Carl Roth GmbH&Co.KG	Schoenperlenstr. 3-5, 76185 Karlsruhe <a href="http://www.carlroth.com/de/de">www.carlroth.com/de/de</a>
Clarivate Analytics	1500 Spring Garden, Philadelphia, PA 19130 USA <a href="http://www.clarivate.com">www.clarivate.com</a>
Corning Incorporated Life Science	One Becton Circle, Durham, NC 27712 USA <a href="http://www.corning.com">www.corning.com</a>
Dr. Schumacher GmbH	Am Roggenfeld 3, 34323 Malsfeld <a href="http://www.schumacher-online.com">www.schumacher-online.com</a>
Eppendorf AG	Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg <a href="http://www.eppendorf.com/DE-de">www.eppendorf.com/DE-de</a>
Fresenius Kabi Deutschland GmbH	Berliner Allee 51, 30855 Langenhagen <a href="http://www.fresenius-kabi.com/de">www.fresenius-kabi.com/de</a>
Greiner Bio-One GmbH	Maybachstr.2, 72636, Frickenhausen <a href="http://www.greinerbioone.com">www.greinerbioone.com</a>
Hecht Assistent ®	Stettener Str. 22-24, 97647 Sondheim vor der Rhön <a href="http://www.assistent.eu">www.assistent.eu</a>
Hexal AG	Industriestr. 25, 83609 Holzkirchen <a href="http://www.hexal.de">www.hexal.de</a>
Hirschmann GmbH&Co.KG	Laborgeräte Hauptstr. 7-15, 74246 Eberstadt <a href="http://www.hirschmann-laborgeraete.de">www.hirschmann-laborgeraete.de</a>
HMC Europe GmbH	Kellerstr. 1, 84577 Tüßling

	<a href="http://www.hmc-europe.com/de">www.hmc-europe.com/de</a>
Hoffmann – La Roche AG	Grenzacherstr. 124, 4070 Basel Schweiz <a href="http://www.roche.com.de">www.roche.com.de</a>
IBM Deutschland	IBM-Allee 1, 71139 Ehningen <a href="http://www.ibm.com/de/de">www.ibm.com/de/de</a>
IKA®-Werke GmbH&Co.KG	Janke&Kunkel-Str. 10, 79219 Staufen <a href="http://www.ika.com">www.ika.com</a>
Kern&Sohn GmbH	Ziegelei 1, 72336 Balingen <a href="http://www.kern-sohn.com">www.kern-sohn.com</a>
Köhler GmbH	In den Wiesen 44, 56070 Koblenz <a href="http://www.koelerchemie.com">www.koelerchemie.com</a>
Labortechnik Medingen	Kleinwolmsdorfer Str. 26, 01477 Arnsdorf <a href="http://www.labortechnik-medingen.de">www.labortechnik-medingen.de</a>
Leicar Microsysteme Vertrieb GmbH Mikroskopie und Histologie	Ernst-Leitz Straße 17-37, 35578 Wetzlar <a href="http://www.leica-microsystems.com">www.leica-microsystems.com</a>
Life Technologies GmbH	Frankfurter Straße 129B, 64293 Darmstadt <a href="http://www.lifetechnologies.com/de">www.lifetechnologies.com/de</a>
Merck KGaA	Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt <a href="http://www.merckgroup.com/de">www.merckgroup.com/de</a>
Mettler-Toledo GmbH	Ockerweg 3, 35353 Gießen <a href="http://www.mt.com/de">www.mt.com/de</a>

Mibe GmbH	Münchnerstr. 15, 06796 Brehna <a href="http://www.mibe.de">www.mibe.de</a>
Microsoft Corporation	One Microsoft Way Redmond, WA 98052- 6399 USA <a href="http://www.microsoft.com/de-de">www.microsoft.com/de-de</a>
PAUL HARTMANN AG	Paul-Hartmann-Str.12, 89522 Heidenheim <a href="http://www.hartmann.de">www.hartmann.de</a>
Pfm medical AG	Wankelstr. 60, 50996 Köln <a href="http://www.pfmmedical.com/de">www.pfmmedical.com/de</a>
R. Langenbrinck GmbH Labor & Medizintechnik	Im Hausgrün 13, 79312 Emmendingen <a href="http://www.langenbrinck.com">www.langenbrinck.com</a>
Reckitt und Benckiser Deutschland GmbH	Darwinstr.2-4, 69115 Heidelberg <a href="http://www.rb.com/de">www.rb.com/de</a>
Sarstedt AG&Co.KG	Sarstedtstr. 1, 51588 Nürnbergrecht <a href="http://www.sarstedt.com">www.sarstedt.com</a>
Sigma Aldrich Chemie GmbH	Riedstr.2, 89555 Steinheim <a href="http://www.sigmaaldrich.com/germany.html">www.sigmaaldrich.com/germany.html</a>
Swedish Orphan Biovitrum GmbH	Fraunhoferstr. 9A, 82152 Martinsried <a href="http://www.sobi-deutschland.de">www.sobi-deutschland.de</a>

## 9 Aufklärungsbogen

 <p>Eberhard-Karls-Universität <b>UKT</b> Universitätsklinikum Tübingen <b>Orthopädische Klinik.</b> Hoppe-Seyler-Straße 3 · 72076 Tübingen</p>	<p><b>9.1.1.1 Universitätsklinikum Tübingen</b></p> <p><b>Orthopädische Klinik</b> <b>Ärztlicher Direktor Prof. Dr. med. N. Wülker</b></p> <p>Sekretariat: 07071/29-86685 Service-Telefon: 07071/29-86033 Vermittlung: 07071/29-86611 Telefax: 07071/29 – 4091</p>
--	--

## Informationsblatt zur Studienteilnahme

Laborleiter PD. Dr. med. Bernd Rolaufts<sup>2</sup>, Dr. med. Ulf K. Hofmann<sup>1</sup>

Tel: 07071-29 81120 Funk: 151-8229

1) Orthopädische Universitätsklinik Tübingen, Hoppe-Seyler Str. 3, Tübingen

2) Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik, Schnarrenbergstr. 95, Tübingen

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient

Anbei finden Sie Informationsmaterial zu folgender Studie:

### **Untersuchungen des Bandscheibengewebes von Patienten mit Erkrankungen oder Verletzungen von Wirbelsäule bzw. der Bandscheiben**

#### Hintergrund:

Im Verlauf von Bandscheibenverletzungen, -erkrankungen (z.B. Bandscheibenvorfall, Osteochondrose) oder Fehlbelastungen (wie z.B. bei Skoliose) verändern sich die Gewebe in den Wirbelkörpern und -gelenken nachhaltig. Dies führt zu Beschwerden und muss häufig durch eine Operation versorgt werden. Diese Prozesse können von Entzündungen begleitet sein. In unseren Untersuchungen wollen wir herausfinden, welche Rolle die Zellen der Bandscheibe im Verlauf dieser Prozesse spielen und welche Veränderungen sie durchlaufen. Dabei werden insbesondere räumliche Anordnungsveränderungen der Zellen zueinander untersucht. Des Weiteren versuchen wir die Kommunikation der Bandscheibenzellen mit dem umgebenden Knorpelgewebe besser zu verstehen.

Wir vermuten, daß eine die Bandscheibenzellen umkleidende Struktur, die sogenannte "perizelluläre Matrix" für den Stoffwechsel und für das Überleben von Bandscheibenzellen unter Belastung funktionell bedeutsam ist. Wir möchten zeigen, daß ein voranschreitender Verschleiß der Bandscheibe zu strukturellen Veränderungen dieser Matrix führt.

Ablauf der Studie:

Sie werden aus rein medizinischen Gründen an der Wirbelsäule operiert. Dabei muss, ebenfalls aus rein medizinischen Gründen, Bandscheibenmaterial entfernt werden. Dieses Gewebe wollen wir – anstatt es zu werfen – untersuchen, um mehr über die Veränderungen zu erfahren, welche sich im Verlauf der entsprechenden Krankheit entwickeln. Dazu werden die Zellen aus dem Gewebe isoliert und unter Wachstumsbedingungen vermehrt. In der weiteren Verarbeitung kann man dann die vermehrten Zellen genauer untersuchen und beschreiben, zum Beispiel Oberflächenstrukturen bestimmen. In weiteren Analysen kann das gewonnene Gewebematerial direkt feingeweblich betrachtet werden, um dabei die strukturellen Veränderungen zu beschreiben.

Aus dem Vergleich der Untersuchungen von Geweben der Patienten verschiedener Verletzungen und Erkrankungen erhoffen wir, Rückschlüsse auf die Ursachen der krankhaften Veränderungen ziehen zu können. Für diese Art von Untersuchung genügt das einmalig entnommene Gewebe vollkommen. Weitere Eingriffe, Untersuchungen, Tests oder Fragebögen gibt es nicht. Die Forschungsarbeiten werden als Einzelstudie ausschließlich in der Universitätsklinik Tübingen sowie der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen durchgeführt. Alle Untersuchungen werden in pseudonymisierter Form durchgeführt, d.h. ihre persönlichen Daten werden verschlüsselt. Nur der Projektleiter hat die Möglichkeit die Daten zu entschlüsseln.

Erläuterungen:

Sie haben keinen persönlichen Nutzen durch diese Untersuchungen. Die Studie soll dazu beitragen, die Diagnose und längerfristig auch die Therapie von Erkrankungen des Bewegungsapparates zu verbessern. Ein erhöhtes Risiko besteht für Sie in keinem Falle, da nur solches Gewebe zur Untersuchung gelangt, welches ausschließlich aus rein medizinischen Gründen entfernt werden muss. Dieses Gewebe würde ansonsten entsorgt (verbrannt) werden, könnte aber mit Ihrem Einverständnis zum Zwecke der o.g. Untersuchungen verwendet werden.

Die Teilnahme an dieser Studie ist absolut freiwillig. Durch die Teilnahme entstehen für Sie keine Vor- und Nachteile, ebenso wenig durch eine Nichtteilnahme. Sie können dieses Einverständnis jederzeit – ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile – widerrufen. Alle Referenzproben, die im Laufe der Studie eingelagert werden, werden nach Ablauf der Studie vernichtet, bei Widerruf erfolgt dies unverzüglich.

 <p>Eberhard-Karls-Universität <b>UKT</b> Universitätsklinikum Tübingen <b>Orthopädische Klinik.</b> Hoppe-Seyler-Straße 3 · 72076 Tübingen</p>	<p><b>9.1.1.1.2 Universitätsklinikum Tübingen</b></p> <p><b>Orthopädische Klinik</b> <b>Ärztlicher Direktor Prof. Dr. med. N. Wülker</b> Sekretariat: 07071/29-86685 Service-Telefon: 07071/29-86033 Vermittlung: 07071/29-86611 Telefax: 07071/29 – 4091</p>
--	---

## Einverständniserklärung zur Studienteilnahme

Laborleiter PD. Dr. med. Bernd Rolauffs<sup>2</sup> Dr. med. Ulf K. Hofmann<sup>1</sup>

Tel: 07071-29 81120 Funk: 151-8229

1) Orthopädische Universitätsklinik Tübingen, Hoppe-Seyler Str. 3, Tübingen

2) Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik, Schnarrenbergstr. 95, Tübingen

### Untersuchungen des Bandscheibengewebes von Patienten mit Erkrankungen oder Verletzungen von Wirbelsäule bzw. der Bandscheiben

Im Gespräch mit der Ärztin / dem Arzt und durch die umseitige Information bin ich über die o.g. Studie, über den Hintergrund, die Ziele, den Ablauf und den Nutzen aufgeklärt worden.

**Informiert wurde ich, dass in dieser Studie keine persönlichen Daten aufgenommen, gespeichert oder publiziert werden. Zur Unterscheidung des Probengewebes werden die Behältnisse mit einem pseudonymen Buchstaben- und Zahlencode versehen. Zur Beurteilung der Ergebnisse werden in pseudonymisierter Form lediglich die Alters- und Geschlechtsverteilung sowie die Hauptdiagnose der Patienten verwendet.**

Informiert wurde ich darüber, dass die Teilnahme an der Untersuchung freiwillig ist, jederzeit und ohne Angabe von Gründen oder ohne dass Vor- und Nachteile entstehen, widerrufen werden kann.

**Eine Kopie des Informationsblattes habe ich erhalten.**

\_\_\_\_\_  
Tübingen, den \_\_\_\_\_ Unterschrift Patient / Patientin

Patientenname in Blockschrift

\_\_\_\_\_  
Tübingen, den \_\_\_\_\_ Unterschrift Arzt / Ärztin  
Blockschrift

Arzt / Ärztin Name in

## 10 Literaturverzeichnis

- ANTONI, C. E. & MANGER, B. 2004. Biotechnologische Medikamente bei entzündlichen Erkrankungen. *Der Internist*.
- ANTONIOU, J., STEFFEN, T., NELSON, F., WINTERBOTTOM, N., HOLLANDER, A. P., POOLE, R. A., AEBI, M. & ALINI, M. 1996. The Human Lumbar Intervertebral Disc-Evidence for Changes in the Biosynthesis and Denaturation of the Extracellular Matrix with Growth, Maturation, Ageing, and Degeneration. *J Clin Invest*, 98, 996-1003.
- BEUBLER, E. 2012. *Kompendium der medikamentösen Schmerztherapie*, Springer.
- BEUBLER, E. 2016. *Kompendium der medikamentösen Schmerztherapie*, Springer.
- BÜHREN, V. & JOSTEN, C. 2013. *Chirurgie der verletzten Wirbelsäule*.
- CHELBERG, M. K., BANKS, G. M., GEIGER, D. F. & OEGEMA JR, T. R. 1994. Identification of heterogeneous cell populations in normal human intervertebral disc. *J Anat*, 43-53.
- DINARELLO, C. A., SIMON, A. & VAN DER MER, J. W. M. 2012. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov.*, 11 (8), 633-652.
- DOMM C, FAY J, SCHÜNKE M & KURZ B 2000. Die Redifferenzierung von dedifferenzierten Gelenknorpelzellen in Alginkultur - Einfluss von intermittierendem hydrostatischem Druck und niedrigem Sauerstoffpartialdruck. *Der Orthopäde - Springer Verlag*, 29, 91-99.
- FANG, F. & JIANG, D. 2016. IL-1 $\beta$ /HMGB1 signalling promotes the inflammatory cytokines release via TLR signalling in human intervertebral disc cells. *Biosci. Rep.*
- FORTH, W., HENSCHLER, D. & RUMMEL, W. 2017. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie* Elsevier.
- G. AUMÜLLER, G. A., A. DOLL, J. ENGELE, J. KIRSCH 2006. *Duale Reihe Anatomie*.
- GRÖNBLAD, M., HABTEMARIAM, A., VIRRO, J., SEITSALO, S., VANHARANTA, H. & GUYER, R. D. 2003. Complement Membrane Attack Complexes in Pathologic Disc Tissue. *Spine*, 28, 114-118.
- HEYDE, C.-E. 2006. *Inflammatorische Reaktion und Apoptose in humanen Bandscheiben nach Frakturen der thorakolumbalen Wirbelsäule* Habilitationsschrift, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin
- HOFMANN, U. K., STEIDLE, J., DANALACHE, M., BONNAIRE, F., WALTER, C. & ROLAUFFS, B. 2018. Chondrocyte death after mechanically overloading degenerated human intervertebral disk explants is associated with a structurally impaired pericellular matrix. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*.
- JONGENELEN, C. J. M. 2006. *Biomechanics in the intervertebral disc*. Part 1 of MSc- Thesis, Eindhoven University of Technology.
- JOOS, U. H. 2009. *Etablierung eines Chondrozyten-basierten in-vitro-Modells zur Testung anti-inflammatorischer Substanzen für die Arthrosetherapie*.
- KANDEL, R., ROBERTS, S. & URBAN, J. P. G. 2008. Tissue engineering and the intervertebral disc: the challenges. *Eur Spine J*, 17, 480-491.
- KÖHNE, C. 2004. *Der humane lösliche Interleukin-6-Rezeptor: Reinigung aus Plasma, Charakterisierung und Nachweis der von einer alternativ gespleißten mRNA translatierten Form* Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen.

- LAUFER, S., GAY, S. & BRUNE, K. 2002. *Rheumatische Erkrankungen und Entzündungen*, Georg Thieme Verlag.
- LIEHN, M., LENGERSDORF, B., STEINMÜLLER, L. & DÖHLER, R. 2016. *OP-Handbuch : Grundlagen, Instrumentarium, OP-Ablauf*, Springer.
- LÖFFLER, G. & PETRIDES, P. E. 2003. *Biochemie&Pathobiochemie*.
- LÜLLMANN-RAUCH, R. 2009. *Taschenlehrbuch Histologie*.
- MILLER, J. A. A., SCHMATZ, C. & SCHULTZ, A. B. 1988. Lumbar Disc Degeneration: Correlation with Age, Sex and Spine Level in 600 Autopsy Specimens. *Spine*, 13, 173-178.
- NAVONE, S. E., MARFIA, G., GIANNONI, A., BERETTA, M., GUARNACCIA, L., GUALTIEROTTI, R., NICOLI, D., RAMPINI, P. & CAMPANELLA, R. 2017. Inflammatory mediators and signaling pathways controlling intervertebral disc degeneration. *Histol Histopathol*, 32, 523-542.
- NIETHARD, F. U. & PFEIL, J. 2005. *Duale Reihe Orthopädie*.
- PAZZAGLIA, U. E., SALISBURY, J. R. & BYERS, P. D. 1989. Development and involution of the notochord in the human spine. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 82, 413-415.
- PFIRRMANN, C. W. A., METZDORF, A., ZANETTI, M., HODLER, J. & BOOS, N. 2001. Magnetic Resonance Classification of Lumbar Intervertebral Disc Degeneration. *Spine*, 26, 1873-1878.
- POOLE, A., RIZKALLA, G., IONESCU, M. & REINER, A. 1993. Osteoarthritis in the human knee: a dynamic process of cartilage matrix degradation, synthesis and reorganization. in *Joint Destruction in Arthritis and Osteoarthritis. Agents Actions Suppl.*, 39, 3-13.
- R.L. DRAKE, W. V., A.W.M. MITCHELL 2007. *Gray's Anatomie*.
- RASPE, H. Rückenschmerzen. Robert-Koch-Institut.
- RASSOW, J., HAUSER, K., NETZKER, R. & DEUTZMANN, R. 2008. *Duale Reihe Biochemie*.
- RICHARDSON, S. M., MOBASHERI, A. J., FREEMONT, A. J. & HOYLAND, J. A. 2007. Intervertebral disc biology, degeneration and novel tissue engineering and regenerative medicine therapies. *Histology and Histopathology*, 1033-1041.
- ROBERTS, S., EVANS, H. & AL., E. 2006. Histology and Pathology of the Human Intervertebral Disc. *The Journal of Bone and Joint Surgery*.
- ROBERTS, S., MENAGE, J., DUANCE, V., WOTTON, S. & AYAD, S. 1991. Collagen Types Around the Cells of the Intervertebral Disc and Cartilage End Plate: An Immunolocalization Study. *Spine*, 16, 1030-8.
- RUCHHOLTZ, S. & WIRTZ, D. C. 2013. *Orthopädie und Unfallchirurgie essentials* Thieme.
- SCHMIDT, R. F., LANG, F. & HECKMANN, M. 2010. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*, Springer Verlag.
- SMITH, L. R., KAJIYAMA, G. & LANE, N. E. 1995. Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs: Effects on Normal and Interleukin 1 Treated Human Articular Chondrocyte Metabolism in Vitro. *The Journal of Rheumatology*, 1130-1137.
- STEIDLE, J. 2016. *Die funktionelle Rolle der perizellulären Matrix im Annulus fibrosus der humanen Bandscheibe*. Eberhard Karls Universität Tübingen.
- VONK, L. A., DOULABI, B. Z., HUANG, C., HELDER, M. N., EVERTS, V. & BANK, R. A. 2010. Preservation of the chondrocyte's pericellular matrix improves cell-induced cartilage formation. *J Cell Biochem*, 110, 260-71.
- WEI, A., SHEN, B., WILLIAMS, L. & DIWAN, A. 2014. Mesenchymal stem cells: potential application in intervertebral disc degeneration. *Translational Pediatrics*, 3, 71-90.
- WILUSZ, E. R., SANCHEZ, J. & GUILAK, F. 2014. The Structure and Function of the Pericellular Matrix of Articular Cartilage. *Matrix Biol*, Oktober 2014.

- ZHANG, F., ZHAO, X., SHEN, H. & ZHANG, C. 2016a. Molecular mechanism of cell death in intervertebral disc degeneration (Review). *International Journal of molecular medicine*, 37, 1439-1448.
- ZHANG, Y., ZHAO, Y., LI, J., WANG, S., LIU, Y., NIE, L. & CHENG, L. 2016b. Interleukin-9 Promotes TNF-alpha and PGE2 Release in Human Degenerated Intervertebral Disc Tissue. *Spine* 41, 1631-1640.

## 11 Lebenslauf

### PERSÖNLICHE ANGABEN

23.Mai.1988                      Geboren in Konstanz als Tochter der Eheleute Fritz-Jürgen Bauer und Ingrid Bauer, geb. Arnold

### SCHULISCHER UND UNIVERSITÄRER WERDEGANG

Juni 2007                      Erwerb der allgemeinen Hochschulreife an der Robert-Gerwig- Schule in Singen (Note 1,6)

WS 2008/2009                      Beginn des Studiums der Zahnheilkunde an der Eberhard Karls Universität in Tübingen

17.03.2010                      Naturwissenschaftliche Vorprüfung

12.12.2012                      Zahnärztliche Vorprüfung

19.11.2015                      Zahnärztliche Prüfung – Eberhard Karls Universität Tübingen (Note gut - 1,8)

### BERUFLICHER WERDEGANG

Juli 2016-Sep 2018                      Vorbereitungsassistentin Praxisklinik der Zahnheilkunde am Luisenhospital in Aachen

Sep 2018 – Februar 2019                      Angestellte Zahnärztin Praxisklinik der Zahnheilkunde am Luisenhospital in Aachen

Seit März 2019                      Angestellte Zahnärztin bei 32zwei in Köln

## 12 Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde am Siegfried Weller Institut der BGU Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. med. Bernd Rolauffs und PD Dr. med. Ulf Krister Hofmann durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch PD Dr. med. Ulf Krister Hofmann.

Sämtliche Versuche wurden von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch PD Dr. med. Ulf Krister Hofmann.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Melina Bauer

Köln, den 14.02.2020