

**Die funktionelle Rolle der perizellulären Matrix im
Annulus fibrosus der humanen Bandscheibe**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Steidle, Jessica Sina

2016

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. B. Rolauffs

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. F. Mittag

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Einordnung der Bandscheibe in den Wirbelsäulenapparat	3
1.2	Zonen der humanen Bandscheibe	5
1.2.1	Der Nucleus pulposus	5
1.2.2	Der Annulus fibrosus	6
1.2.3	Die Grund- und Deckplatte	7
1.3	Die extrazelluläre Matrix in der humanen Bandscheibe	8
1.3.1	Die perizelluläre Matrix in der humanen Bandscheibe	11
1.4	Biomechanik der humanen Bandscheibe.....	13
1.5	Degeneration der humanen Bandscheibe.....	16
1.6	Verwendung tierischen Materials	18
1.7	Zielsetzung der Arbeit	21
2	Material und Methoden.....	22
2.1	Material.....	22
2.1.1	Farbstoffe	22
2.1.2	Antikörper	22
2.1.3	Lösungen und Puffer	22
2.1.4	Verbrauchsmaterialien.....	23
2.1.5	Geräte	25
2.1.6	Software	25
2.2	Methoden.....	26
2.2.1	Probengewinnung und Aufbereitung des Probenmaterials.....	26
2.2.1.1	Bovines Bandscheibengewebe	26
2.2.1.2	Humanes Bandscheibengewebe	28
2.2.2	Biomechanische Belastung.....	31
2.2.3	Life/Dead-Zellfärbung.....	33
2.2.4	Anfertigen von Kryoschnitten.....	36
2.2.5	Färbung der Perizellulären Matrix	37
2.2.6	Fluoreszenzmikroskopie.....	43
2.2.8	Fluoreszenzaufnahmen der Zellen	44

2.2.9	Fluoreszenzaufnahmen der Perizellulären Matrix	45
2.2.10	Auswertung der Gewebeproben	47
2.2.11	Statistische Auswertung	51
3	Ergebnisse	53
3.1	Datenanalyse der untersuchten Patienten	53
3.2	Analyse der Zelldichte	60
3.3	Analyse der im Bandscheibengewebe vorkommenden Zellmuster	64
3.4	Analyse lebender und toter Zellen in den einzelnen Mustern	71
3.5	Analyse toter und lebender Zellen	74
3.6	Auswertung der perizellulären Matrix	78
4	Diskussion	87
4.1	Repräsentative Stichprobe	87
4.2	Zwischen der Probenhöhe und der Dichte der toten Zellen in der humanen Bandscheibe besteht keine Korrelation	87
4.3	Die Zelldichte in der humanen Bandscheibe ist konstant unabhängig von Belastung und Gewebequalität	88
4.4	Belastung fördert die Apoptose der Zellen	89
4.5	Schädigungsanfälligkeit unterschiedlich degenerierter Gewebe	91
4.6	Einzelne Zellen und Paare sind die Hauptorganisationsform in der humanen Bandscheibe	91
4.7	Der Grad der Degeneration des Gewebes besitzt Einfluss auf die Organisation der Zellen in verschiedene Muster	93
4.8	Bei Belastung werden vor allem gesunde Zellformationen angegriffen	94
4.9	Durch Belastung wird PZM abgebaut	94
4.10	Tote Zellen besitzen weniger PZM als noch lebende Zellen	96
4.11	Die Ausprägung der PZM ist abhängig vom Degenerationsgrad des vorliegenden Gewebes	97
4.12	Mögliche Therapieansätze regenerativer Knorpeltherapie	97
5	Zusammenfassung	99
6	Abkürzungsverzeichnis	101
6.1	Einheiten und Größenordnungen	102

7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	103
8	Firmenverzeichnis	107
9	Aufklärungsbogen.....	109
10	Quellen	112
11	Anhang	116
12	Erklärung zum Eigenanteil.....	124
13	Danksagung	125

1 Einleitung

Die Bandscheibe sorgt für Flexibilität und dämpft auf die Wirbelsäule wirkende Lasten¹. Sie besteht aus einem zentralen gallertartigen Kern, dem Nucleus pulposus, einem äußeren fibrösen Ring, dem Annulus fibrosus und der Grund- und Deckplatte aus hyalinem Knorpel^{1,2}.

Die extrazelluläre Matrix des Nucleus pulposus besteht hauptsächlich aus wasserbindenden Glykosaminoglykanen, die sich in einem Netz aus Kollagen-II-Fasern befinden. Alltägliche Belastungen führen zu einer Druckbelastung des Nucleus pulposus, wodurch die Zellen, meistens Chondrozyten, hohe hydrostatische Drücke, jedoch nur geringe Volumenänderungen erfahren³. Die auf ihn wirkenden Kräfte verteilt der Nucleus pulposus gleichmäßig auf den um ihn herum liegenden Annulus fibrosus¹, der dadurch bei Druckbelastung unter Zugspannung steht und sich deformiert mit Ausbeulung nach außen⁴.

Der Annulus fibrosus wird unterteilt in einen inneren und einen äußeren Bereich. Die extrazelluläre Matrix des Annulus fibrosus besteht zu zwei Dritteln aus konzentrisch angeordneten Lamellen dicht gepackter Kollagenfasern vor allem des Kollagentyp I, wobei die Kollagenfasern des inneren Annulus nicht ganz so dicht und weniger streng angeordnet sind als die des äußeren Annulus². Die Zellen des Annulus liegen zwischen den Kollagenfasern.

Obwohl die Zellen lediglich 1 % der extrazellulären Matrix in der Bandscheibe ausmachen, sind sie es, welche die Matrix produzieren und aufrechterhalten⁵.

Die Zellen des in dieser Arbeit im Fokus stehenden Annulus fibrosus produzieren größtenteils Typ I- und II-Kollagen⁶, wobei die wichtigsten Stimulanzen der Zellen mechanischer Stress, die Versorgung mit Nährstoffen und die osmotische und ionische Umgebung darstellen⁷.

Unterteilt wird die Matrix der Bandscheiben in die interterritoriale Matrix, die zwischen den Chondronen liegt und hauptsächlich aus Kollagen Typ I und II besteht. Die territoriale Matrix, in einem gewissen Abstand um die Zelle herum liegend und aus Kollagen Typ III bestehend und die perizelluläre Matrix, direkt um die Zelle herum liegend und charakteristischerweise bestehend aus einem hohen Anteil an Typ VI-Kollagen⁸.

Die Bandscheibe und mit ihr die perizelluläre Matrix rücken immer mehr in den wissenschaftlichen Fokus. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Funktion der perizellulären Matrix speziell im Bereich des äußeren Annulus fibrosus bei mechanischer Belastung. Laut Broom und Myers 1980 agiert diese perizelluläre Matrix nämlich als eine Art Belastungssensor, wodurch die Zelle eine metabolische Antwort auf die auf sie wirkende Belastung geben kann⁹.

Bisher spricht vieles dafür, dass die perizelluläre Matrix zum Schutz der Chondrozyten dient und dass sie als eine Art mechanischer Umwandler agiert, welcher die Chondrozyten unter Belastung beeinflusst.

Im Laufe des Lebens ist die Wirbelsäule immer wiederkehrenden Belastungen ausgesetzt. Die Kombination dieser Belastungen hat zusammen mit dem vorliegenden Erbgut und dem Alterungsprozess Einfluss auf die Gewebe der Wirbelsäule¹⁰ mit daraus resultierenden morphologischen Veränderungen, welche als degenerativ chronische Prozesse beschrieben werden können⁴.

Bei Bandscheibendegeneration kommt es zum Flüssigkeitsverlust in der extrazellulären Matrix und bereits in frühen Degenerationsstadien zur Auflockerung des Kollagenfasergewebes, wobei Risse bei Belastung im Gewebe des Annulus fibrosus entstehen können¹¹. Im weiter fortgeschrittenen Stadium der Degeneration beschrieben Gruber et al. in morphologischen Studien ein gehäuftes Auftreten von konzentrisch angeordneten, Kokon-artigen Schichten aus Kollagen VI um die Zelle herum. Bis heute ist unklar, ob diese erhöhte Produktion an Kollagen VI die Funktion, das Überleben und die Proliferation der Zellen der Bandscheibe reguliert¹¹.

Zudem zeigten bereits Roluffs et al. 2010, dass sich die Zellorganisation mit zunehmender Degeneration verändert. Während in gesundem Gelenkknorpel vor allem einzelne Zellen, Zellen in Paaren und perlschnurartige „strings“ (Zellreihen von mindestens 3 Zellen) zu finden sind, zeigt degenerierter Gelenkknorpel eine Zunahme der Zelldichte und damit einhergehend die Zellformationen „double Strings“ (zwei direkt nebeneinander liegende Zellreihen von jeweils mindestens 3 Zellen) und Cluster (Zellanhäufungen)¹².

Fast jeder leidet im Laufe seines Lebens unter Rückenschmerzen. Diese werden oft durch Gewebeveränderungen, welche bei der altersabhängigen Degeneration oder aufgrund erhöhter mechanischer Belastung entstehen, hervorgerufen. Ziel neuer therapeutischer Ansätze, welche bisher vor allem bei Gelenkknorpelschäden angewandt werden, ist es, einen vorliegenden Schaden frühzeitig zu erkennen und durch regenerative Therapiemaßnahmen eine weitere Degeneration zu verhindern oder zumindest zu verzögern¹³. Um eine solche Therapie auch bei der Bandscheibe in Zukunft ermöglichen zu können sind weitere Untersuchungen auf Zellebene notwendig.

Bisher sind die wissenschaftlichen Erkenntnisse im Bereich des Gelenkknorpels aufgrund der sowohl einfacheren Gewebegewinnung, wie auch leichter zugänglichen und oft mit weniger Morbidität verbundenen operativen Versorgung deutlich weiter vorangeschritten. Gerade durch die Fortschritte im Bereich der Wirbelsäulen Chirurgie in den letzten zwei Jahrzehnten rückt aber nun auch zunehmend die Untersuchung von humanem Bandscheibengewebe in den wissenschaftlichen Blickpunkt.

Zentraler Punkt dieser Arbeit und möglicher Ansatz zukünftiger therapeutischer Verfahren stellt die Rolle der perizellulären Matrix des Annulus fibrosus bei mechanischer Belastung dar.

1.1 Einordnung der Bandscheibe in den Wirbelsäulenapparat

Die 23 Bandscheiben des Wirbelsäulenapparates befinden sich zwischen den Wirbelkörpern und sind mit deren Grund- und Deckplatte und der knöchernen Randleiste verwachsen. Durch die dadurch entstehenden Synchondrosen, eine Verbindung zweier Knochen mit dazwischen liegendem Knorpelgewebe, hier der Bandscheibe, garantiert die Wirbelsäule die Rumpfbeweglichkeit und die Dämpfung und Stabilität bei axialen Stößen. Eine Ausnahme dieser knorpelhaften Verbindung bilden die ersten beiden Halswirbel, sie bilden sogenannte Diarthrosen, echte Gelenke, mit Gelenkspalt zwischen den Knochen aus.

Unterteilt wird die Wirbelsäule in Halswirbelsäule (Pars cervicalis, HWK 1 - HWK 7), Brustwirbelsäule (Pars thoracalis, BWK 1 – BWK 12), Lendenwirbelsäule (Pars lumbalis, LWK 1 – LWK 5), Kreuzbein (Os sacrum), in welchem 4 - 6 Wirbelkörper miteinander verwachsen vorliegen und Steißbein (Os coccygis), bestehend aus 2 - 5 Segmenten. Charakteristisch ist eine Doppel-S-Form mit Biegung nach ventral (Lordose) im Bereich der Hals- und Lendenwirbelsäule und eine Biegung nach dorsal (Kyphose) im Bereich der Brustwirbelsäule und des Kreuzbeins.

Funktionell gesehen ist die Wirbelsäule aus verschiedenen Bewegungssegmenten aufgebaut. Diese bestehen aus zwei benachbarten Wirbeln mit der dazwischen liegenden Bandscheibe, den Wirbelbogengelenken und den ligamentären und muskulären Strukturen. Mögliche Bewegungen in einem Bewegungssegment sind eine Ventralflexion bzw. Dorsalextension, eine Lateralflexion und eine Rotation. Zudem lassen die Wirbelbogengelenke ein gewisses Gelenkspiel zu, worunter man zusätzlich die Bewegungen wie Kompression, Dehnung und translatorische Verschiebung versteht.

Die Halswirbelsäule besitzt den größten Bewegungsumfang, vornehmlich aufgrund der echten Gelenke zwischen den ersten beiden Halswirbeln im oberen und unteren Kopfgelenk (Articulatio atlantooccipitalis und atlantoaxialis).

Die Brustwirbelsäule besitzt trotz der höchsten Anzahl an Bewegungssegmenten den geringsten Bewegungsumfang, aufgrund ihrer Einbindung in den Thorax.

Die Lendenwirbelsäule besitzt nur eine geringe Rotationsfähigkeit, da diese durch die annähernd sagittal stehenden Gelenkfortsätze eingeschränkt wird³, dafür aber eine ausgeprägte Fähigkeit zur Inklination und teilweise auch Reklination.

1.2 Zonen der humanen Bandscheibe

1.2.1 Der Nucleus pulposus

Der zentrale Anteil der Bandscheibe besitzt eine gallertartige isotrope extrazelluläre Matrix, die den Großteil des Nucleus ausmacht. Die Gewebekonsistenz beruht hauptsächlich auf einer hohen Konzentration an negativ geladenen Glykosaminoglykanen, bestehend aus langen Disacharidketten mit hohem Wasserbindungsvermögen, wodurch der Nucleus seinen Quellungsdruck entfaltet und großen Belastungsdrücken standhalten kann¹⁴. Die Glykosaminoglykane sind verwoben in einem Netzwerk aus mäßig angeordneten Kollagenfasern des Kollagentyps II¹⁵. Dieses Kollagennetzwerk steht in Verbindung mit dem Netzwerk des inneren Annulus und zum Teil auch mit der Deckplatte.

Tagsüber wird unter Druckbelastung beim Stehen und Gehen Wasser aus dem Nucleus durch den Annulus nach außen gepresst. Eine Regeneration erfolgt durch Rehydrierung des Nucleus während der nächtlichen Ruhephase. Dieser Ein- und Ausstrom von Extrazellulärflüssigkeit sichert die Ernährung des bradytrophen Bandscheibengewebes³.

Die Nucleuszellen entstammen der Chorda dorsalis. Diese entsteht in der frühen Embryonalphase aus dem Endoderm⁷. Sie können große Vakuolen und prominente Zytoskelettanteile wie F-Aktin aufweisen¹⁶. Die Anzahl dieser Zellen im Gewebe verringert sich jedoch sehr schnell. Ersetzt werden die der Chorda dorsalis entstammenden Zellen durch Chondrozyten-artige Zellen. Dieses Phänomen wurde erstmalig 1989 beschrieben durch U. Pazzaglia et al. in einer Studie an humanem fetalen (ab 8 Wochen) und kindlichen (bis 10 Jahre) Bandscheibengewebe. Sechs Wochen postnatal konnte festgestellt werden, dass noch 2000 Zellen/mm² der aus der Chorda dorsalis stammenden Zellen im Nucleus pulposus vorhanden waren. Mit einem Jahr waren nur noch 100 Zellen/mm² vorhanden, mit vier Jahren konnten keine der aus der Chorda dorsalis stammenden Zellen mehr gefunden werden¹⁷.

Der Nucleus des Erwachsenen enthält in etwa 4×10^6 Zellen/ml¹⁸, welche

Chondrozyten-ähnlich¹⁹ und im Vergleich zu den Zellen des Annulus fibrosus eher rundlich sind²⁰ und mehr Zytoplasma beinhalten²¹. Die Chondrozyten-ähnlichen Zellen des Nucleus pulposus besitzen spezifische Marker wie N-Cadherin und Keratin-19¹⁹. Zudem besitzen sie eine deutlich sichtbare perizelluläre Matrix um die Zelle herum, die reich an Kollagen III und VI ist, diese Struktur nennt sich Chondron⁶.

1.2.2 Der Annulus fibrosus

Der äußere Anteil der Bandscheibe wird in zwei Bereiche unterteilt, den inneren Annulus, der in Verbindung mit dem Nucleus steht und den äußeren Annulus.

Die extrazelluläre Matrix des Annulus fibrosus besteht zu zwei Dritteln aus konzentrisch angeordneten Lamellen dicht gepackter Kollagenfasern des Kollagentyp I. Die Kollagenfasern des inneren Annulus sind hierbei nicht ganz so dicht und weniger streng angeordnet sind als die des äußeren Annulus¹⁸. Die Fasern der äußeren Lamellen strahlen in die knöchernen Randleisten und in die Ligg. longitudinale anterior und posterior ein. Die Fasern der inneren Lamellen in die knorpelige Deckplatte der Wirbelkörper mit Übergang in die Gallerte des Nucleus pulposus³.

Die in etwa 9×10^6 Zellen/ml des Annulus fibrosus¹⁸, Chondrozyten, entstammen dem Mesenchym und weisen viele Charaktereigenschaften von Fibroblasten auf. Hierzu zählen beispielweise die Synthese von Typ I- und II-Kollagen, sowie aggregierenden Proteoglykanen²⁰, deren Konzentration sich von den äußeren Bereichen zum Nucleus hin steigert. Die Proteoglykane bestehen aus Proteoglykan-Monomeren, jedes dieser Monomere besitzt ein Kernprotein mit daran verankerten Glykosaminoglykanen¹. Die Zellen sind besonders im äußeren Annulus eher länglich, da sie zwischen den dicht gelagerten Kollagenfasern der extrazellulären Matrix liegen, mit denen sie verbunden sind²¹. Die Zellen des inneren Annulus sind eher rundlich, da hier das Kollagenfasernetzwerk weniger dicht ist. Die Zellen des Annulus fibrosus können, wie auch die Zellen des Nucleus pulposus, von einer perizellulären

Matrix umgeben sein²², die reich an Kollagen III und VI ist und mit denen sie gemeinsam das sogenannte Chondron bildet⁶.

1.2.3 Die Grund- und Deckplatte

Die aus dem Mesoderm entstehenden knorpeligen Grund- und Deckplatten der Bandscheiben sind mit den ossären Grund- und Deckplatten der angrenzenden Wirbelkörper verwachsen. Sie bestehen aus einer dünnen Schicht aus hyalinem Knorpel mit parallel und horizontal angeordneten Kollagenfasern. Die Kollagenfasern der kartilaginären Endplatte der Bandscheibe sind immer durch eine verkalkte Knorpelschicht, die ossäre Endplatte des Wirbelkörpers, vom knöchernen Wirbelkörper getrennt²³.

Nach der Geburt nehmen die Grund- und Deckplatten etwa die Hälfte des Wirbelkörperzwischenraums ein, im Erwachsenenalter lediglich noch 5 %. Sie sind durchsetzt mit einer Vielzahl an Gefäßkanälen, die sich kurz nach der Geburt mit extrazellulärer Matrix füllen, sodass nach dem ersten Lebensjahrzehnt keine Kanäle mehr übrig bleiben. Im selben Zug reduzieren sich die Blutgefäße zwischen den Lamellen des Annulus fibrosus, wobei einige wenige Gefäße zur Versorgung im äußeren Bereich erhalten bleiben⁷.

Beim Kind obliegt der Grund- und Deckplatte die Funktion als Wachstumsplatten des dazugehörigen Wirbelkörpers. Ihre Struktur ähnelt der Epiphysenfuge in den langen Röhrenknochen, diese Struktur geht während der Skelettreifung verloren. Beim Erwachsenen ist die Grund- und Deckplatte lediglich noch eine 0,6 mm dicke Schicht aus hyalinem Knorpel, die 90 % der Grenzfläche zwischen Bandscheibe und Wirbelkörper bedeckt. Im äußersten Randbereich des Annulus fibrosus wird die Bandscheibe lediglich durch eine Schicht verkalkten Knorpels vom Wirbelkörperknochen getrennt²³.

Die Chondrozyten der knorpeligen Deckplatte gleichen denen des Annulus fibrosus, sind eher länglich und ähneln Fibroblasten⁷.

1.3 Die extrazelluläre Matrix in der humanen Bandscheibe

Die extrazelluläre Matrix der Bandscheibe besteht hauptsächlich aus Kollagenen, Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen¹.

Den größten Anteil der extrazellulären Matrix bilden die so genannten Proteoglykane². Diese werden nochmals unterteilt in zwei Klassen, die Hyaluronsäure-bindenden und die nicht Hyaluronsäure-bindenden Proteoglykane¹. Sie sind in einem straffen Netz aus Kollagenfasern, zu 80 % bestehend aus Typ I- und Typ II-Kollagen, eingelagert².

Die Proteoglykane bestehen aus Proteoglykan-Monomeren. Jedes dieser Monomere besitzt ein Kernprotein. Dieses Kernprotein besteht im Bandscheibengewebe aus Hyaluronsäure. Daran gebunden ist das Proteoglykan Aggrecan mit daran verankerten Glykosaminoglykanen, Chondroitinsulfat und Keratansulfat. Diese aus langen Disaccharidketten bestehenden Glykosaminoglykane sind negativ geladen und binden viele Natriumionen, welche wiederum Wassermoleküle anziehen und somit für den Wassergehalt des Bindegewebes zuständig sind³. In der Bandscheibe ist das Proteoglykan Aggrecan für den Wasser-bindenden Effekt verantwortlich durch seine Bindung an sulfatierte Glykosaminoglykan-Ketten¹.

Adhäsive Glykoproteine vernetzen geformte und ungeformte Matrixkomponenten untereinander und verankern sie über Adhäsionsrezeptoren (Integrine) an der Zellmembran³.

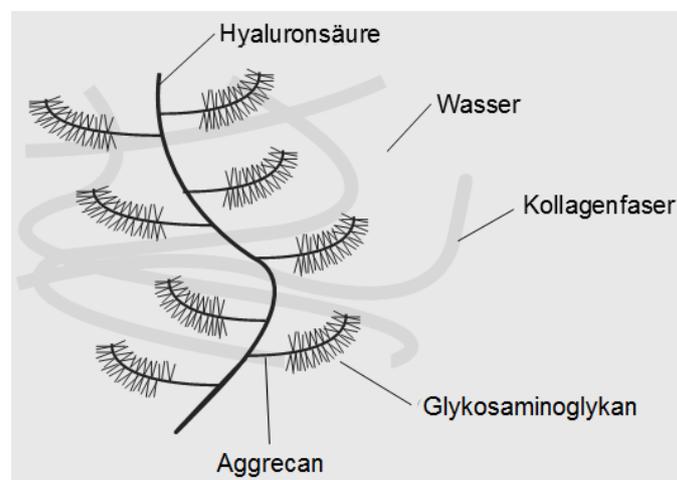


Abb. 1: Aufbau der extrazellulären Matrix mit ihren Hauptbestandteilen und deren Anordnung.

Neben den Haupt-Kollagentypen I und II, kommen in der Matrix zu einem geringen Anteil die Kollagentypen III, V, VI, IX, XI, XII und XIV vor⁵, deren genaue Rolle im Knorpel jedoch noch weitgehend ungeklärt ist.

Kollagenfasern sind zugfest, strecken sich unter Belastung also nur in geringem Maße. Sie bestehen aus Kollagenfibrillen, welche wiederum aus Mikrofibrillen aufgebaut sind. Die Dicke einer Mikrofibrille wird bestimmt durch die Anzahl an Tropokollagen, einer Superhelix mit hohem Gehalt der Aminosäuren Glycin, Prolin und Lysin³.

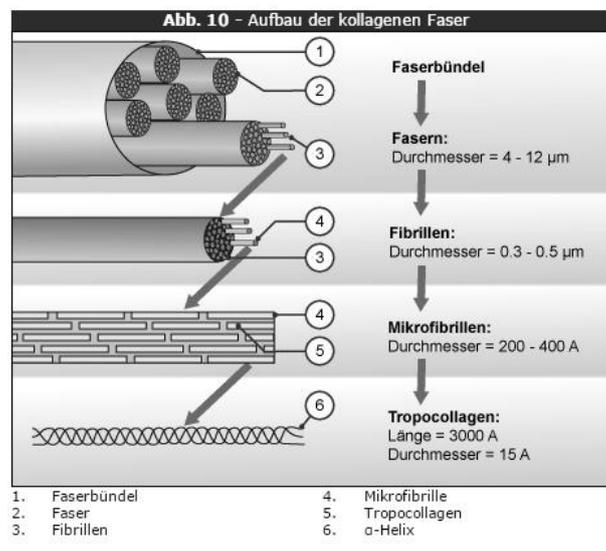


Abb. 2: Schematischer Aufbau der kollagenen Faser (1). Ein kollagenes Faserbündel (2) besteht aus einzelnen Fasern (3), welche aus einem Bündel von Fibrillen (4) bestehen. Die Fibrillen bestehen aus einem Mikrofibrillenbündel (5). Die Mikrofibrillen selbst bestehen aus einem Bündel von aneinandergereihten Tropocollagen-Molekülen (6). Abbildung vom Departement de Médecine, Division d'Histologie de l'Université de Fribourg mit Erlaubnis.

Unterteilt wird die Matrix der Bandscheiben in die interterritoriale Matrix, die zwischen den Chondronen liegt und hauptsächlich aus Kollagen Typ I und II besteht. Eine territoriale Matrix, die direkt um die perizelluläre Kapsel herum liegt und aus Kollagen Typ III besteht. Direkt um die Zelle herum liegt die so genannte perizelluläre Matrix innerhalb der perizellulären Kapsel, sie besteht aus Typ III- und Typ VI-Kollagen⁶. Die perizelluläre Kapsel wurde von C. Poole 1984 beschrieben und besteht aus einem Netzwerk feiner Kollagenfibrillen, die

zirkulär um die Peripherie der perizellulären Matrix angeordnet sind².

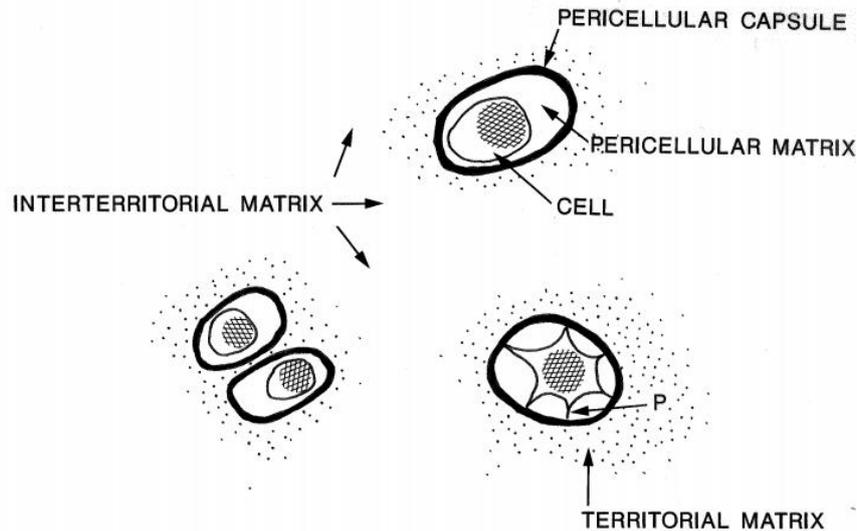


Abb. 3: Zonen innerhalb der Extrazellulären Matrix der Bandscheibe. Direkt um die Zelle herum liegt die perizelluläre Matrix umgeben von einer perizellulären Kapsel. Die territoriale Matrix umgibt die perizelluläre Kapsel und die interterritoriale Matrix liegt zwischen den Chondronen. P=Projektionen der Zellmembran. Abbildung von Roberts S. et al. (1991)⁶ mit Erlaubnis.

Die Matrix wird von den Zellen, welche hier in nur sehr geringer Anzahl (ca. 1 % des Volumens der gesamten Matrix) vorhanden sind, produziert und aufrechterhalten.

Der Annulus fibrosus ist charakterisiert durch kompakt aneinander liegende Kollagenfasern. Die Chondrozyten sind in diesem Gewebe eher länglich entlang der Hauptfaserrichtung ausgerichtet und ähneln in ihrem Aspekt den Fibroblasten⁷. Entsprechend der Kollagenzusammensetzung des Annulus produzieren die Annulus-Chondrozyten größtenteils Typ I- und II Kollagen⁸. Der äußere Annulus fibrosus ist reich an Kollagen Typ I. Der hohe Anteil dieses Kollagentyps ist charakteristisch für zugbelastetes, eher fibröses Gewebe²⁴.

Dem gegenüber steht der Nucleus pulposus. Hier sind die Chondrozyten eher rundlich bis oval, da sie im weniger dichten Kollagenfasernetz liegen⁷. Die Zellen des Nucleus produzieren hauptsächlich Typ II-Kollagen, zudem noch Typ IX- und Typ XI-Kollagen⁸. Der Nucleus besitzt einen hohen Anteil an Typ II-

Kollagen, typisch für druckbelastetes, kartilaginäres Gewebe.

Der innere Annulus als Übergangszone hat Gemeinsamkeiten mit druck- und zugbelastetem Gewebe und besteht aus Typ I- und II-Kollagen²⁴.

Die Zellen sind auf die Kapillaren im Bereich des äußeren Annulus, sowie auf Diffusion von Nährstoffen über die hyaline Deckplatte angewiesen um ihren Nährstoffbedarf zu decken und um ihre metabolischen Abfallprodukte zu beseitigen¹⁵.

Die wichtigsten Stimulanzen der Zellen sind mechanischer Stress, die Versorgung mit Nährstoffen und die osmotische und ionische Umgebung, wobei die Zellen abhängig von ihrer Lage unterschiedlich darauf reagieren²². Die Zellen des Nucleus sind eher druckbelastet, die des Annulus fibrosus eher zugbelastet.

1.3.1 Die perizelluläre Matrix in der humanen Bandscheibe

Die perizelluläre Matrix in der humanen Bandscheibe besteht aus einem sehr feinen Netzwerk aus dünnen, verzweigten Kollagenfasern². Charakteristisch ist das Vorkommen von Kollagen Typ VI. Das Vorkommen dieses Kollagentyps unterscheidet sie auch von der interterritorialen und territorialen extrazellulären Matrix²⁵. Kollagen VI besteht aus drei verschiedenen Polypeptidketten, der alpha 1-Kette mit 140 kDa, der alpha 2-Kette mit 130 kDa und der alpha 3-Kette mit 200 kDa²⁶. Die alpha 3-Kette ist die größte Kette des Proteinkomplexes und funktioniert als Zell-bindendes Protein, wobei sie auch für die Organisation der Matrixkomponenten von Bedeutung ist²⁷.

Zudem findet man im Vergleich zur extrazellulären Matrix eine höhere Konzentration an Proteoglykanen² wie Aggrecan, Biglykan und Decorin. Auch Hyaluronsäure, Glykoproteine wie Fibronectin und Laminin, sowie die Kollagentypen II, III, IX und XI finden sich hier²⁵.

Wichtig für die Entwicklung und den Erhalt des Knorpelgewebes der Bandscheibe ist die Interaktion zwischen Chondrozyt und der extrazellulären Matrix. Da die perizelluläre Matrix die Zelle vollständig umgibt, wird jedes Signal

das die Zelle erreicht durch die perizelluläre Matrix beeinflusst. Es wird daher vermutet, dass die perizelluläre Matrix die Präsentation biochemischer und biophysikalischer Faktoren reguliert und damit die Zellbiosynthese kontrolliert²⁶. Außerdem steht im Raum, dass diese Zell-Matrix-Interaktionen an der perizellulären Matrix eine wichtige Rolle spielen bei der Zellantwort auf mechanische Belastung durch Beeinflussung des Transports von Makromolekülen und der lokalen Gewebespannung um die Zelle herum²⁶.

Bereits Broom und Myers zeigten 1980, dass die perizelluläre Matrix nämlich als eine Art Belastungssensor agiert, wodurch die Zelle eine metabolische Antwort auf die auf sie wirkende Belastung geben kann⁹.

Bisher ist allerdings wenig bekannt über die tatsächlich stattfindenden zellbiologischen Mechanismen. Die mechanische Belastung führt zum angepassten Verlust an interstitiellem Wasser in der perizellulären Matrix²⁸. Dadurch ist die Konzentration an Proteoglykanen verhältnismäßig erhöht und die Zellen setzen im nun hyperosmolaren Milieu vorübergehend mehr eines sogenannten sekundären Botenstoffs, wie intrazelluläres Calcium, frei. Zudem führen Veränderungen des osmotischen Drucks unter Belastung zu einer Verformung des Zytoskeletts²⁹. Diese Veränderungen regulieren dann nachgeschaltete Effekte wie die Genexpression und die posttranslationale Biosynthese durch die Zelle²².

Neben der Funktion als Belastungssensor, soll die perizelluläre Matrix die Zelle direkt durch ihre Steifigkeit schützen. 1998 zeigten M.Knight et al. in einer Studie an Gelenkknorpel, dass die perizelluläre Matrix die Zelle bei Druckbelastung vor Verformung schützt³⁰. 2001 veröffentlichten sie dann in einer Zellmechanik-Studie mit aus Gelenkknorpel isolierten Chondronen und Chondrozyten (ohne perizelluläre Matrix) zum Vergleich, dass die Festigkeit der perizellulären Matrix größer als die der Zellen zu sein scheint²⁵. Durch die in dieser Studie verschiedenen angewendeten Extraktionsverfahren konnten M.Knight et al. zudem die Wichtigkeit der mechanischen und physiko-chemischen Integrität des Chondrons in seiner Mikroumwelt zeigen, da diese das Verhalten der Chondrozyten und ihre Reaktion auf Belastung beeinflusst²⁵. Möglicherweise ist die perizelluläre Matrix in der Bandscheibe also ein

funktioneller Teil im Knorpel, welcher der Regulation der mechanischen Umgebung und somit dem Schutz der Chondrozyten dient.

Die Form und Ausprägung der perizellulären Matrix der Chondrone kann differieren³¹.

S. Roberts et al. zeigten 1991 in ihrer Studie über Kollagentypen um die Chondrozyten der Bandscheibe und der Deckplatten, dass Zellen des Nucleus pulposus eine deutlicher sichtbare perizelluläre Matrix aufweisen als die Zellen vor allem des äußeren Annulus fibrosus. Sie assoziierten damit, dass die kompressive Belastung auf die Zellen des Nucleus wohlmöglich stärker einzuschätzen ist, als die Zugbelastung die auf die Zellen vor allem des äußeren Annulus fibrosus wirkt⁶.

In degenerativ verändertem Knorpelgewebe ist die perizelluläre Matrix weiterhin, allerdings in veränderter Form, vorhanden, wie H. Gruber et al. 2007 in ihrer Studie über die morphologische Komplexität der perizellulären Matrix des Annulus fibrosus in der humanen Bandscheibe zeigen konnten.

Bereits in frühen degenerativen Stadien sind die Kollagenfasern weniger dicht gepackt und die perizelluläre Matrix bildet eine Kokon-artige Hülle aus Kollagen VI um die Zelle herum aus. Allerdings bilden nicht alle Zellen einer von Degeneration betroffenen Region diese konzentrisch angeordneten Schichten aus Kollagen VI aus. Bis heute ist unklar, ob diese erhöhte Produktion an Kollagen VI die Funktion, das Überleben und die Proliferation der Zellen der Bandscheibe reguliert¹¹.

1.4 Biomechanik der humanen Bandscheibe

Die Bandscheiben garantieren die Flexibilität der Wirbelsäule und dämpfen axiale Stöße bei Belastungen, dazu gehören jegliche Bewegungen, Muskelaktivitäten und Gelenkbelastungen. Durch die Belastungen entstehen Zugkräfte, Druckkräfte und Schubkräfte die auf die Bandscheiben wirken und Volumenänderungen, Flüssigkeitsströme, Druckänderungen, elektrokinetische Effekte und Formänderungen der Bandscheiben bewirken.

Bei Druckbelastung erfährt der Nucleus pulposus hohe hydrostatische Drücke, jedoch kaum Volumenänderungen durch seinen hohen Gehalt an inkompressibler Flüssigkeit, welche durch die negativ geladenen Proteoglykane im Gewebe gehalten wird²⁵. Die auf ihn wirkenden Kräfte verteilt der Nucleus pulposus gleichmäßig auf den zirkulär um ihn herum liegenden Annulus fibrosus³², der dadurch bei Druckbelastung unter Zugspannung gerät und unter leichter Deformation nach außen die Kräfte in sich aufnimmt⁴. Die Lamellen und der Faserknorpel halten diesen Zugkräften bei physiologischer Gelenkbewegung stand. Bei der Degeneration der Bandscheibe kommt es zu veränderter Matrixzusammensetzung mit reduzierter Wasserbindungskapazität. Diese Veränderung führt zum Verlust der Hydrierung des Nucleus pulposus und somit zu einem geringeren Flüssigkeitsdruck³². Durch den Flüssigkeitsverlust entsteht bei Belastung eine geringere Druckdämpfung durch den Nucleus²², wobei sich die Zugkräfte die auf den Annulus wirken verringern, die wirkenden Schub- und Druckkräfte sich allerdings immens steigern³².

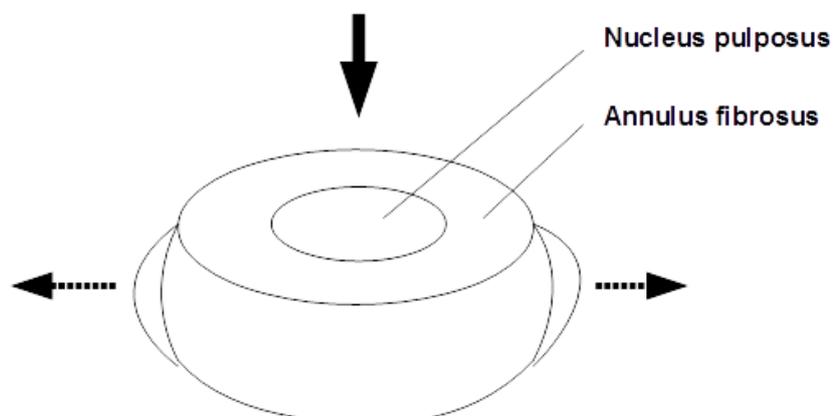


Abb. 4: Kraftwirkung in der belasteten Bandscheibe. Unter Druckbelastung zeigt die Bandscheibe eine deutliche „Ausbeulung“ des Annulus fibrosus.

Auf Zellebene regulieren die bei alltäglicher Belastung auftretenden Stimuli den Zellmetabolismus und führen zu einem zell-vermittelten Umbau innerhalb der Bandscheibe. Dieser Umbau ist notwendig für den Erhalt der Bandscheibe, allerdings können dadurch auch degenerative Veränderungen erzeugt werden.

Die biologischen Antworten der Zellen in der Bandscheibe variieren abhängig von der anatomischen Region und deren extrazellulärer Matrix, welcher sie angehören, dem Belastungstyp, der Stärke und der Dauer der Belastung²².

Die rundlichen Zellen des Nucleus pulposus erfahren, wie bereits beschrieben, hohe hydrostatische Drücke nahezu ohne Volumenänderung. Querverlaufende Zugbelastungen und axiale Druckbelastungen, die auf die Zellen wirken können, sind zu jeder Zeit kleiner als die, die auf ihre extrazelluläre Matrix wirken³².

Die eher länglichen Zellen des äußeren Annulus stehen unter einer Zugbelastung, die der um sie herum liegenden extrazellulären Matrix entspricht. In degeneriertem Gewebe erfahren die Zellen des äußeren Annulus allerdings bis zu fünffach höhere Druckbelastungen als ihre extrazelluläre Matrix. Volumenänderungen die mit dieser höheren Druckbelastung einhergehen sind im äußeren Annulus gering, Schubbelastungen wirken hier signifikant auf die Matrix, nicht aber auf die Zelle³².

Weniger längliche Zellen, welche sich überwiegend im inneren Annulus fibrosus finden, erfahren größere Volumenverluste und höhere Belastungen. Da die Volumenänderungen und die wirkende Kraft im inneren und äußeren Annulus identisch zu sein scheinen, wird vermutet, dass die länglichen Zellen, welche sich vor allem im äußeren Annulus befinden, an diese Umgebung besser angepasst sind. Dadurch können sie Volumenverluste und Zelldehnung durch Zugkräfte minimieren³².

Generell kann also die Stärke der mechanischen Stimuli auf Zellebene stark abweichen von derjenigen, die auf die extrazelluläre Matrix wirkt²².

Die perizelluläre Matrix kann die auf die Zelle wirkenden Kräfte reduzieren durch Modifizierung der lokalen mechanischen Umgebung der Zelle²². In einer Studie an Gelenkknorpel von M. Knight et al. 1998 konnte am Gelenkknorpel gezeigt werden, dass die perizelluläre Matrix die Zelle bei Druckbelastung vor Verformung schützt³⁰.

Ist das Gewebe und somit auch die extrazelluläre Matrix um die Zelle herum bereits geschädigt, wirken veränderte mechanische Stimuli auf Zellebene bis hin zur Überlastung der Zelle. In deren Folge kommt es letztendlich vermehrt zu katabolischen Aktivitäten, einer abnehmenden Matrixbiosynthese und schließlich zum Zelltod. Bisher ist wenig bekannt über die Mechanismen, welche die Zellveränderungen regulieren und die Rolle, welche hierbei mechanischen Kräften zukommt. Man weiß allerdings, dass die Zellantwort über sekundäre Botenstoffe reguliert wird, die nachgeschaltete Effekte wie Genexpression und posttranslationale Biosynthese beeinflussen²².

1.5 Degeneration der humanen Bandscheibe

Beim Neugeborenen finden sich kleine Blutgefäße im Bereich des äußeren Annulus fibrosus, welche gelegentlich bis in den inneren Annulus hineinreichen. Der Nucleus pulposus nimmt hier noch in etwa die Hälfte der Bandscheibe ein, mit einer großen Anzahl an stark hydrierten Proteoglykanen und einigen wenigen Kollagenfasern. Während der Skelettreifung vergrößert sich das Volumen der Bandscheibe, damit allerdings auch der Abstand der zentralen Nucleusregion zu den peripher liegenden Blutgefäßen, die sich zudem im Verlauf zurückbilden und beim Erwachsenen kaum noch vorhanden sind¹⁴. Die Rückbildung der Blutgefäße in Annulus fibrosus und der Deckplatte ist möglicherweise Auslöser der folgenden Matrixdegeneration⁷. Die Konzentration der Kollagenfasern im Nucleus steigt stetig an, während die Proteoglykankonzentration mit zunehmendem Alter abnimmt. Hierdurch verringert sich die Menge an Flüssigkeit in der Bandscheibe, wodurch sie ihre Form und ihr Volumen verändert. Diese Veränderung, welche in einem immer mehr fibrotisch werdenden Nucleus endet, hindert die Bandscheibe daran mechanische Belastungen zu dämpfen und gleichmäßig zu verteilen¹⁸.

Außerdem nimmt der innere Annulus immer mehr zu Lasten des Nucleus einen größeren Bereich der Bandscheibe ein. Der Annulus verliert seine normale Kollagenfaserstruktur, Fissuren und Risse bilden sich aus, die bis in die zentrale

Nucleusregion der Bandscheibe reichen können¹⁴. Bereits ab dem zweiten Lebensjahr sind vermehrt Zelltod und auch eine erhöhte Zelldichte und Proliferation der Zellen des Nucleus pulposus zu beobachten³³. Die ursprünglich in großer Anzahl vorkommenden, der Chorda dorsalis abstammenden Zellen, welchen insgesamt ein höheres regeneratives Potential zugeschrieben wird, sind kaum mehr vorhanden und durch verstreut liegende Chondrozyten-artige Zellen ersetzt¹⁴.

Bei älteren Menschen nimmt die Bandscheibenhöhe immer weiter ab¹⁴ und die Anzahl und das Ausmaß der Risse immer weiter zu. Zudem lagert sich eosinophiles granuläres Material als Folge von Entzündungsprozessen ab³³. Die Grenze zwischen Annulus fibrosus und Nucleus pulposus wird immer undeutlicher und trotz Zellproliferation mit Zellanhäufungen²², sogenannter Clusterbildung, verbleiben nur wenige lebende Zellen¹⁴.

Trotz dieser unaufhaltbaren altersabhängigen Veränderungen, könnte eine Regeneration des Bandscheibengewebes möglich sein. Bereits 1984 konnten Bradford et al. in ihrer Studie „Chymopapain, Chemonucleosis und Nucleus pulposus Regeneration“ beweisen, dass die Entfernung der alten Matrix die Zellen des Nucleus befähigt zu proliferieren und neue Matrix zu synthetisieren³⁴. Die bereits beschriebenen altersabhängigen Veränderungen sind, wenn auch oft ähnlich erscheinend, abzugrenzen von der pathologischen Degeneration der Bandscheiben.

Die unabhängig vom Alter auftretende pathologische Degeneration wird oft assoziiert mit bestimmten Umweltfaktoren. Dazu zählen beispielsweise das Rauchen, Vibrationen, denen der ganze Körper ausgesetzt ist und schwere Lasten die über die Lebenszeit verteilt getragen werden^{35,36,37}. Neben diesen Umweltfaktoren kann auch eine vorliegende genetische Prädisposition zur frühzeitigen Degeneration des Bandscheibengewebes führen¹⁸. Wie auch bei der altersabhängigen Gewebedegeneration kommt es hier zur Zellproliferation mit Cluster-Bildung und vermehrt auftretendem Zelltod²². Die Zytokinproduktion ist gesteigert und spielt möglicherweise eine Rolle in der Regulation Matrixabbauender Enzyme. Matrix-Moleküle wie Kollagen Typ I, III, VI und X, Elastin, Fibronectin und Amyloid werden gebildet oder verändern ihre Verteilung in der

Bandscheibe⁶. Der Gehalt an Glykosaminoglykanen sinkt⁷, wodurch der Nucleus pulposus an hydrostatischem Druck verliert. Die Kollagenlamellen werden zerstört und es bilden sich Fissuren. Es kommt zur Bildung neuer Gefäße und zur Steigerung der Innervation⁴.

Die oft ähnlichen Veränderungen bei altersabhängiger und pathologischer Degeneration machen es allerdings schwer zwischen den beiden zu differenzieren.

1.6 Verwendung tierischen Materials

Da die Techniktablierung in dieser Arbeit mit bovinem Bandscheibengewebe vorgenommen wurde, beleuchtet dieses Kapitel Gemeinsamkeiten und Unterschiede bovinen und menschlichen Bandscheibengewebes.

Entwicklungsgeschichtlich sind die Zellen der Chorda dorsalis im humanen Gewebe des Nucleus pulposus lediglich bis im jungen Erwachsenenalter vorhanden und werden dann durch Chondrozyten-ähnliche Zellen ersetzt¹⁴. Diese Chondrozyten-ähnlichen Zellen gehören morphologisch und funktionell zu einem komplett differenten Zelltyp als die Zellen der Chorda dorsalis³⁸.

Bovines Gewebe ähnelt in diesem Punkt sehr dem humanen Gewebe. Es können einige Zellen der Chorda dorsalis bei Geburt existieren, die Zelldichte nimmt jedoch wie auch beim Menschen sehr rasch ab³⁹. Dieses Kriterium ist für die Wahl des experimentellen Organismus von entscheidender Bedeutung, da die Chorda dorsalis Zellen ein ausgeprägt pluripotentes und hohes regeneratives Potential besitzen³⁸.

Das primäre Ossifikationszentrum wird bei den meisten Säugern durch den zentralen Kern des Wirbelkörpers gebildet. Sekundäre Zentren entstehen meistens am kaudalen und kranialen Ende des Wirbelkörpers. Beim Menschen beschränken sich die Ossifikationszentren auf die peripheren Anteile des Wirbelkörpers und formen dort eine ringförmige Epiphysenfuge welche ca. im 25. Lebensjahr komplett verschlossen ist. Somit ist die Basis der Grund- und Deckplatte die Wachstumsregion des Wirbelkörpers beim Menschen.

Bei Rindern bleibt eine Epiphysenplatte im Wirbelkörper bestehen³⁹.

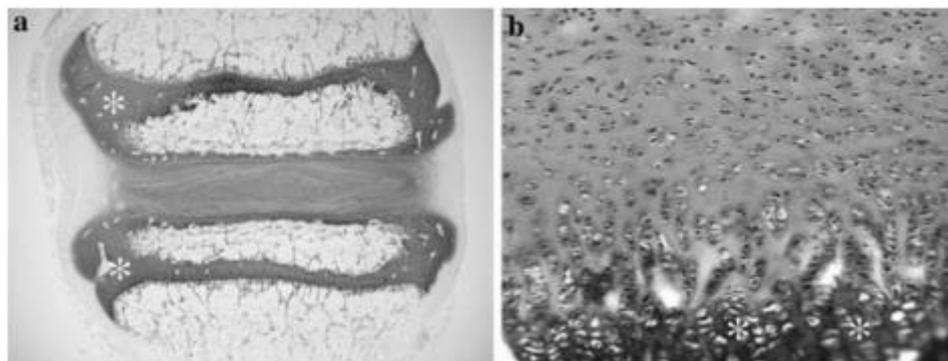


Abb. 5: Wachstumszone in unterschiedlichen Spezies (a) im Schaf (entspricht dem Rind) verbindet die Epiphysenplatte (Stern) die Bandscheibe mit dem Wirbelkörper (b) beim Menschen befindet sich die Wachstumsfuge (Stern) an der Basis der Deckplatte. Abbildung von Alini M. et al. (1991)³⁹ mit Erlaubnis.

Anatomisch vergrößert sich beim Menschen der horizontale Durchmesser der Wirbelkörperendplatten und die Höhe der Bandscheiben von kranial nach kaudal. Die Form der humanen Bandscheibe zeigt eine konvexe Krümmung beidseits³⁹.

Der antero-posteriore Durchmesser der Wirbelkörperendplatten beim Rind bleibt über die gesamte Wirbelsäule annähernd gleich⁴⁰. Die Höhe der Bandscheiben ist bei Rindern konstanter von kranial nach kaudal, wobei sie tendenziell kranial eher noch etwas höher ist im Vergleich zum Menschen. Eine konvexe Krümmung der bovinen Bandscheibe findet sich lediglich auf der kranialen Seite, die kaudale Seite zeigt eine konkave Krümmung. Zusätzlich besteht bei verschiedenen Spezies eine Varianz der Bandscheibenanzahl in verschiedenen Abschnitten der Wirbelsäule³⁹, sowie sich auch die Eigenschaften der Bandscheiben und Wirbel in verschiedenen Regionen der Wirbelsäule unterscheiden⁴¹. Elliott et al. konnten hierzu in einer 2004 veröffentlichten Studie an Mäusen und Ratten zeigen, dass Bandscheiben aus der Schwanzregion eher Beugebelastung ausgesetzt sind, die Bandscheiben der Lendenwirbelsäule eher Kompressionsbelastung. Diese funktionellen Unterschiede führen zu unterschiedlicher Geometrie und somit auch

unterschiedlicher mechanischer Eigenschaften in den beiden Wirbelsäulenabschnitten⁴¹.

Die Biomechanik des humanen und bovinen Bandscheibengewebes betrachtend, sind die absoluten Werte des Bewegungsumfangs beim Rind in der Lendenwirbelsäule, dies wird vor allem bei Flexion und Extension deutlich, etwas geringer als beim Menschen. Dies rührt daher, dass beim Menschen, im Gegensatz zum Rind, die Flexion und Extension des Stammes hauptsächlich im Lumbalbereich ausgeführt wird³⁹.

Beim Menschen lastet das Gewicht des gesamten Oberkörpers auf der lumbalen Wirbelsäule. Dies ist beim Rind nicht so, weshalb oftmals fälschlicherweise angenommen wird, dass die Last hier geringer ist als beim Menschen³⁹. Tatsächlich zählen zur wirkenden Last korrekterweise auch Muskelkontraktion und Spannung der passiven Strukturen wie z.B. der Bänder⁴¹. Diese zusätzliche Last ist bei größeren Vierbeinern wie Rindern sicherlich höher als beim Menschen einzuschätzen, da eine horizontal ausgerichtete Wirbelsäule mehr Muskelkraft und passive Spannung benötigt. Somit wirken auf die bovine Lendenwirbelsäule sehr wahrscheinlich mehr Kräfte als auf die humane Lendenwirbelsäule. Bisher liegen dazu in der Literatur keine genaueren Messungen vor. Die Bandscheiben im Schwanz des Rindes werden vor allem durch Muskelkontraktion und Spannung passiver Strukturen belastet³⁹. Am häufigsten wird in wissenschaftlichen Arbeiten Gewebe des Schwanzes verwendet, in dieser Arbeit wurde allerdings entschieden Gewebe der LWS zu nehmen. Wie bereits oben erwähnt zeigten Elliott et al. 2004 an Mäusen und Ratten, dass die Belastung des Schwanzes eher dynamisch ist und hier somit weniger vergleichbar scheint als die Kompressionsbelastung der Lendenwirbelsäule⁴¹. Zudem soll der Fokus dieser Arbeit auf mikrobiomechanischen Aspekten liegen.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die Zellen des Annulus fibrosus können, wie auch die Zellen des Nucleus pulposus, von einer perizellulären Matrix umgeben sein²², die reich an Kollagen III und VI ist und gemeinsam das sogenannte Chondron bilden⁶.

Die perizelluläre Matrix als ein Bestandteil der extrazellulären Matrix im Bandscheibengewebe umgibt die Zelle vollständig, wodurch jedes Signal das die Zelle erreicht durch sie beeinflusst wird. Es wird daher davon ausgegangen, dass die perizelluläre Matrix die Präsentation biochemischer und biophysikalischer Faktoren reguliert und damit die Zellbiosynthese kontrolliert²⁶.

Diese Zell-Matrix-Interaktionen in der perizellulären Matrix spielen vermutlich eine wichtige Rolle bei der Zellantwort auf mechanische Belastung durch Beeinflussung des Transports von Makromolekülen und der lokalen Gewebespannung um die Zelle herum²⁶.

Hauptziel dieser Arbeit war es zu zeigen, ob eine einmalige Kompression von humanem Bandscheibengewebe die Apoptose der Zellen fördert und ob das Überleben der Chondrozyten abhängig von der Ausprägung der perizellulären Matrix ist. Hierzu wurde untersucht, ob bei den toten Zellen eine geringere Ausprägung der perizellulären Matrix vorliegt. Zudem wurde untersucht, ob sich durch diese Belastung die Ausprägung der perizellulären Matrix verändert.

Untersucht wurde unterschiedlich degeneriertes Gewebe, hier sollte geklärt werden, ob eine unterschiedliche Ausprägung der perizellulären Matrix abhängig vom Degenerationsgrad vorliegt.

Zudem wurden die Zellmuster in den unterschiedlich degenerierten Bandscheibenproben analysiert. Gezeigt werden sollte damit, dass die Ausprägung unterschiedlicher Zellmuster abhängig vom Degenerationsgrad ist. Außerdem sollte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass Chondrozyten in Mustern, welche für eine ausgeprägte Degeneration des Gewebes typisch sind, eine dementsprechend geringere Ausprägung der perizellulären Matrix besitzen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Farbstoffe

Tabelle 1: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

Farbstoff	Hersteller
Propidium-Iodid aus dem Cell Viability Imaging Kit (Kat. Nr. 06 432 379 001)	Roche Diagnostics GmbH
CellTracker™ Blue CMAC (Kat. Nr. C2110)	Life Technologies GmbH
DAPI (Kat. Nr. D1306)	Life Technologies GmbH

2.1.2 Antikörper

Tabelle 2: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper

Antikörper	Hersteller
Col6A3 (N-12) (Kat. Nr. sc-131140)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
donkey anti-goat IgG-FITC (Kat. Nr. sc-2024)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

2.1.3 Lösungen und Puffer

Tabelle 3: Verwendeten Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Hersteller/Bestandteile
Unkonjugiertes Eseserum (Kat. Nr. 017-000-121)	Dianova GmbH
DMEM/F-12, GlutaMAX™ Supplement 500 ml (Kat. Nr.31331-028)	Life Technologies GmbH
FBS Superior 50 ml (Kat. Nr. S0615)	Biochrom GmbH
Fungizone® Antimycotic 5 ml (Kat. Nr. 15290-026)	Life Technologies GmbH

Lösung/Puffer	Hersteller/Bestandteile
L-Ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate 125 µl (Kat. Nr. A8960)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Penicillin Streptomycin 10 ml (Pen Strep) (Kat. Nr. 15140122)	Life Technologies GmbH
DPBS, Dulbecco Phosphate Buffered Saline (Kat. Nr.10010-015)	Life Technologies GmbH
Tween®20 (Kat. Nr. 473206488)	Carl Roth GmbH + Co. KG

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
96 well-cell culture plate, sterile with lid (Kat. Nr. 657 160)	Greiner Bio-One GmbH
Eppendorf Tubes (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml) (Kat. Nr. 0030 121.023/086/094)	Eppendorf AG
Eppendorf Research plus (2,5 µl; 10 µl; 100 µl; 200 µl; 1000 µl) (Kat. Nr. 3120 000.011/020/046/054/062)	Eppendorf AG
SurPhob® Pipettenspitzen (10 µl; 100 µl; 200 µl; 1000 µl) (Kat. Nr. VT0210/VT0230/VT0240/VT0260)	Biozym Scientific GmbH
Falcon® Serological Pipet 5 ml (Kat. Nr. 357543) 10 ml (Kat. Nr. 357551) 25 ml (Kat. Nr. 357525)	Corning Incorporated Life Sciences
Desinfektionsmittel Descosept AF (Kat. Nr. 00-311-100)	Dr. Schumacher GmbH
CELLSTAR® Polypropylen Röhrchen (Kat. Nr. 210261), 50 ml	Greiner Bio-One GmbH,
Petrischalen Standard, 60 x 15 mm (Kat. Nr. 628102)	Greiner Bio-One GmbH,
Objektträger mit Mattrand, Kanten geschnitten 26 mm x 76 mm x 1 mm (Kat. Nr. 03-0002)	R.Langensbrinck Labor- und Medizintechnik

Verbrauchsmaterial	Hersteller
SuperFrost® Plus Objektträger, geschliffen 25 mm x 75 mm x 1 mm (Kat. Nr.03-0040)	R.Langenbrinck Labor- und Medizintechnik
Deckgläser 18 mm x 18 mm (Dicke 0,13 - 0,16 mm) (Kat. Nr. 01-1818/1)	R.Langenbrinck Labor- und Medizintechnik
Standard Biopsiestanze 6 mm (Kat. Nr. 48601)	pfm medical ag
TissueTek O.C.T.™ Compound (Kat. Nr. SAK4583)	Sakura Finetek Europe B.V.
Feather microtome blade S35 (Kat. Nr. 207500000)	pfm medical ag
Dako Fluorescent Mounting Medium (Kat. Nr. S3023)	Dako Deutschland GmbH,
Super Pap Pen, Liquid Blocker (Kat. Nr. N71310)	Science Services GmbH
Schraubbecher 100 ml, PP (Kat. Nr.75.562.105)	Sarstedt AG & Co Kommanditgesellschaft
Handschuhe, Peha-soft® nitrile white, powderfree (Kat. Nr.9422062)	PAUL HARTMANN AG
Pinzetten	Aesculap AG
Feather disposable scalpel (Kat. Nr. 02.001.30.021)	pfm medical ag

2.1.5 Geräte

Tabelle 5: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
CO ₂ -Inkubator zur Zellkultivierung	BINDER GmbH
Wasserbad W12	Labortechnik Medingen
Pipettierhilfe Pipetboy „Pipetus“ (Kat. Nr. 9907200)	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG
Rüttelplatte IKA Vibrax-VXR	IKA®-Werke GmbH & CO. KG
Kryotom Leica CM3050S	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Mikroskopie und Histologie
Sterilbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH
Carl Zeiss Observer Z1	Carl Zeiss Microscopy GmbH

2.1.6 Software

Tabelle 6: Verwendete Software

Software	Hersteller
Axio Vision Rel. 4.8 Ink.	Carl Zeiss Microscopy GmbH
Dynamic Aquisition	National Instruments
Mendeley Desktop Version 1.13.8	Glyph&Cog
Microsoft Word	Microsoft Corporation
OpenOffice	The Apache Software Foundation
SPSS Statistics 22	IBM Deutschland GmbH

2.2 Methoden

2.2.1 Probengewinnung und Aufbereitung des Probenmaterials

2.2.1.1 Bovines Bandscheibengewebe

Probengewinnung:

Verwendet wurde Gewebe von gesunden Rindern, zur Verfügung gestellt vom Schlachthof in Rottenburg am Neckar. Hierbei wurde nur Gewebe von Tieren verwendet die maximal einen Tag vor der Gewebepräparation geschlachtet wurden, um noch lebende Zellen im Knorpel vorzufinden. Die Tiere wurden dabei unabhängig von den Forschungsarbeiten geschlachtet, es wurde nur Gewebe verwendet, was ohnehin bei der Schlachtung anfiel. Eine Genehmigung der Abteilung 32 Veterinärwesen und Lebensmittelüberwachung des Landratsamtes Tübingen wurde eingeholt.

Tabelle 7: Verwendete Rinderproben

Rind	Geschlecht	Alter in Monaten	Rasse
1	m	30	Holstein-Schwarzbunt
2	w	53	Holstein-Schwarzbunt
3	m	22	Fleckvieh
4	m	26	Fleckvieh
5	m	31	Fleckvieh
6	m	27	Fleckvieh
7	m	29	Fleckvieh
8	m	27	Wasserbüffel

Tabelle 7 zeigt die verschiedenen Rinder deren Gewebe zur Protokolletablierung verwendet wurden, dokumentiert wurde Geschlecht (*m = männlich, w = weiblich*), Alter (*in Monaten*) und die Rasse.

Aufbereitung des Probenmaterials:

Die Bandscheiben waren bei Abholung noch im Wirbelsäulenapparat der hier verwendeten Lendenwirbelsäule integriert und mussten zunächst aus den Wirbelkörperzwischenräumen heraus präpariert werden. Dies erfolgte in toto mittels Skalpell und anatomischer Pinzette (siehe Abb. 6).

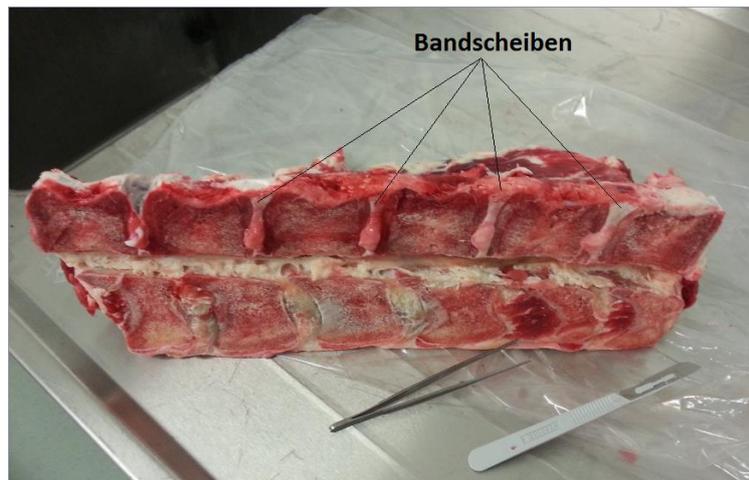


Abb. 6: Wirbelsäulenapparat eines Rindes mit noch integrierten Bandscheiben.

Im Anschluss daran wurden die heraus präparierten Bandscheiben in DPBS gewaschen, um Blutreste zu entfernen. Aus den gewaschenen Bandscheiben konnten dann Zylinder mit einem Durchmesser von 6 mm mit Hautbiopsiestanzen aus dem Annulus fibrosus ausgestanzt werden. Diese Zylinder wurden im CO₂-Inkubator in Kulturmedium bei 37° Celsius und 5 % CO₂ aufbewahrt. Um für die später folgende biomechanische Belastung genormte Zylinder zu erhalten, wurde ein selbstgebautes Zylinderschneidegerät verwendet:

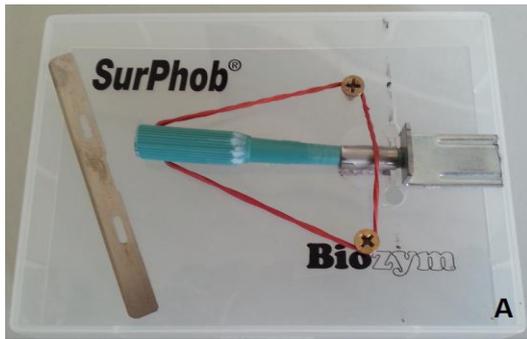


Abb. 7: Zylinderschneidegerät. **(A)** In den Metallzylinder des Schneidegeräts wird der Bandscheibenzylinder eingefügt und mit der Kryotomklinge zugeschnitten. **(B)** Vergrößerte Darstellung des Zwischenraums zwischen Metallstopp und Metallzylinder wodurch eine einheitliche Zylinderhöhe definiert wurde.

Hierbei wurde der gestanzte Zylinder in das im Innendurchmesser 6 mm messende Metallrohr eingeführt, mit leichtem Druck gegen den Metallstopp gedrückt und mit einer Kryotomklinge am Metallrohr entlang abgeschnitten. Der Abstand zwischen Absetzungslinie am Metallrohr und Metallstopp, der die Höhe der entstehenden Zylinder definiert, beträgt 1 mm.

2.2.1.2 Humanes Bandscheibengewebe

Probengewinnung:

Es wurde Gewebe aus dem Annulus fibrosus von Bandscheiben verwendet, welche bei Wirbelsäulenoperationen, meistens infolge degenerativer Veränderungen, entnommen wurden. Patienten, welche für eine hierfür geeignete Operation vorgesehen waren wurden spätestens am Tag vor der Operation über die Studie und die Möglichkeit zur Gewebespende informiert und bei Interesse mündlich wie schriftlich durch ärztliches Personal aufgeklärt (Aufklärungsbogen im Anhang). Ein positives Ethikvotum der Ethikkommission Tübingen lag vor (Projektnummer: 244/2013BO2). Die Proben wurden postoperativ in sterilen Schraubbechern mit oben beschriebenem Kulturmedium versetzt mit einem Fungizid (Amphotericin B) und zwei Antibiotika (Penicillin 10,000 U/ml und Streptomycin 10,000 µg/ml) aufbewahrt und binnen 8 h aus

der Crona Klinik Tübingen (Hoppe-Seyler-Straße 3, 72076 Tübingen) abgeholt.

Tabelle 8: Verwendete humane Proben

Patient	Geschlecht	Alter	WS-Abschnitt	Diagnose
1	W	74	LWK 3/4	Glutealgie rechts bei Anschlussdegeneration LWK 3/4 (mit hochgradiger Spinalkanalstenose)
2	W	66	LWK 4/5	therapieresistente, chronische Lumboischialgie links bei Osteochondrose L 3- S 1 und Olisthese L 4/5
3	M	53	LWK 3/4	Chronische, therapieresistente Lumboischialgie rechts bei Anschlussdegeneration LWK 3/4 mit spinaler Enge
4	M	29	LWK 4/5	chronische, therapieresistente Ischialgie links bei Spinalkanalstenose L 4/5 und zentralem BSV
5	M	65	LWK 4/5	LWK 4 Kompressionsfraktur mit hochgradiger Kompression des Spinalkanals
6	W	70	BWK 10/11	Lumboischialgie links bei degenerativ thorakaler Instabilität, Hauptlokalisation BWK 10/11, resistente Beinschwäche bei spinaler Enge
7	M	50	LWK 3/4 + LWK 5/ SWK 1	akute Lumboischialgie mit Fußheberparese KG 0 von 5 links bei Re-BSV L 5/ S 1 links und L 3/4 nach kaudal umgeschlagen
8	W	62	LWK 4/5 + LWK 5/ SWK1	chronische therapieresistente Lumboischialgie bds. bei Osteochondrose L 4- S 1 mit sek. spinaler Enge
9	M	29	LWK 5/ SWK 1	Nucleus pulposus Prolaps LWK 5/ SWK 1 mediolateral rechts mit intraspinaler Kompression der S 1-Wurzel
10	m	51	LWK 4/5	chronische therapieresistente Lumbalgie bei monosegmentaler Osteochondrose LWK 4/5
11	w	58	LWK 3/4	Lumbofemoralgie rechts mit mehretagiger Osteochondrose und Facettengelenksarthrose
12	m	37	LWK 1/2	Z.n. dorsaler Stabilisierung LWK 2 mit Fixateur Interne
13	w	42	LWK 4/5	Spondylolisthese Grad 1 nach Meyerding LWK 4/5
14	w	70	LWK 5/ SWK 1	Bandscheibenprolaps LWK 5/ SWK 1 rechts
15	m		LWK 3/4 + LWK 4/5 + LWK 5/ SWK 1	sekundäre Spinalkanalstenose LWK 3/4+LWK 4/5 bei Osteochondrose LWK 3- SWK 1

Tabelle 8 zeigt die verwendeten humanen Bandscheiben pro Proband, aufgelistet sind hier die Patienten-ID, das Geschlecht (m = männlich, w = weiblich), das Alter (in Jahren), die Bandscheibenlokalisation und die Diagnose. BWK = Brustwirbelkörper, LWK = Lendenwirbelkörper; SWK = Sakralwirbelkörper; WS = Wirbelsäule; BSV = Bandscheibenvorfall.

Aufbereitung des Probenmaterials:

Das Bandscheibengewebe wurde direkt nach Erhalt unter der Sterilbank in einer Petrischale genauer betrachtet. Es wurde dabei differenziert, welche Gewebestücke für die mechanische Belastung weiterverwendet werden konnten. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass tatsächlich Gewebe aus dem Annulus fibrosus und nicht dem Nucleus pulposus weiterverarbeitet wurde. Zudem durfte das Gewebestück eine gewisse Größe nicht unterschreiten, um gestanzt werden zu können. Entscheidend war auch die Ausrichtung der Fasern des Faserknorpels, da vor Beginn der Studie festgelegt worden war, dass senkrecht zur Faserrichtung gestanzt werden sollte. Das passende Gewebestück wurde dann mit einer 6 mm-Hautbiopsiestanze in Zylinderform gebracht. Die fertigen Zylinder konnten aufgrund ihrer weicheren Konsistenz nicht wie die Zylinder aus Rindergewebe mit dem angefertigten Schneidegerät in eine definierte Höhe gebracht werden, daher entstanden geringe Differenzen in der letztendlichen Zylinderprobenhöhe.

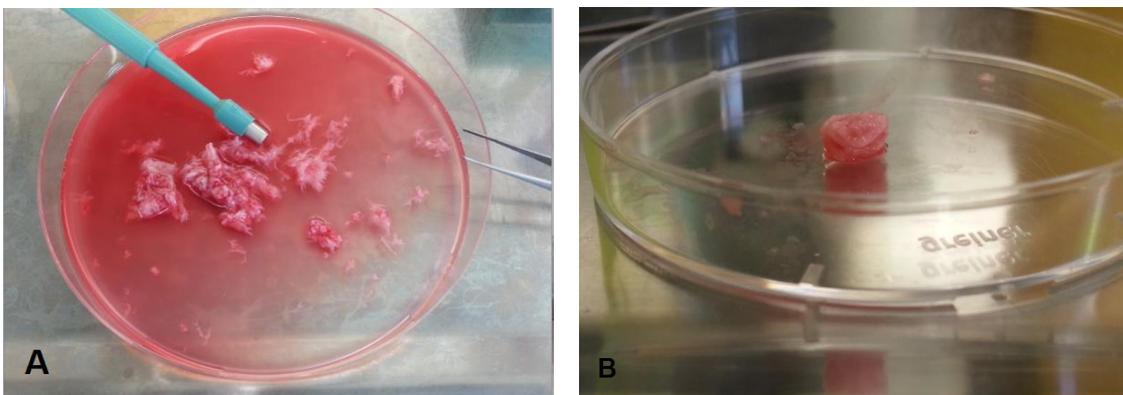


Abb. 8: Humane Probenzubereitung in der Petrischale mit **(A)** intraoperativ gewonnenem Gewebe und **(B)** dem gestanzten Gewebezylinder von 6 mm Durchmesser.

Die angefertigten Zylinder wurden in Kulturmedium im CO₂-Inkubator bei 37° Celsius und 5 % CO₂ aufbewahrt und spätestens am Folgetag mechanisch belastet.

2.2.2 Biomechanische Belastung

Die biomechanische Belastung erfolgte mittels eines biaxialen Gewebebelastungsapparates, der eine Wegeauflösung von 1 μm besitzt und aufgrund seiner Größe (30 cm x 25 cm x 20 cm) in einen Standard-Inkubator passt. Das Gerät besteht aus einer Boden- und einer Deckenplatte, die mit drei Säulen verschraubt sind (siehe Abb. 9). Eine zusätzliche dritte Platte erlaubt eine Höhenverstellung der Probenkammer. Ein linearer Schrittmotor (23 - 6102 A) ist an der Deckenplatte befestigt und bewegt über ein Gewinde ein Kompressionselement. Dieses kann Kompressionen bis zu 1 mm/s mit einer Kraft bis zu 400 N leisten. Der Apparat wird über ein dazugehöriges Computer gesteuertes Datenerfassungssystem „Dynamic Acquisition“ kontrolliert und gesteuert⁴².

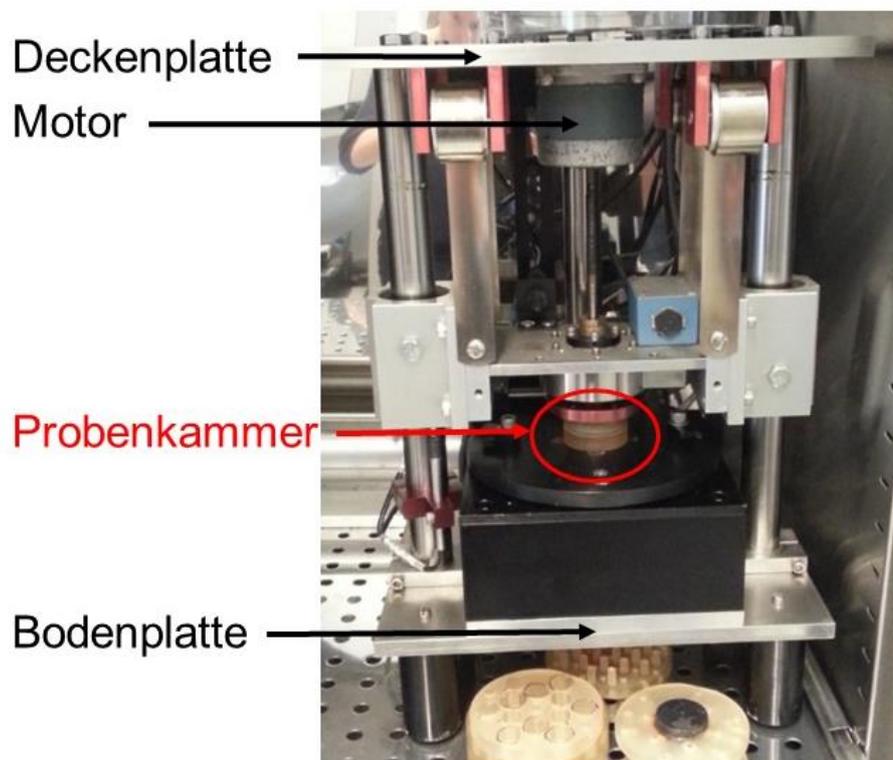


Abb. 9: Biomechanische Belastungsmaschine (Siegfried-Weller-Institut, Waldhörlestraße 22, 72072 Tübingen).



Abb. 10: Deckel und Boden der Probenkammer in welche ein Bandscheibenzylinder eingelegt wurde (Siegfried-Weller-Institut, Waldhörnlestraße 22, 72072 Tübingen).

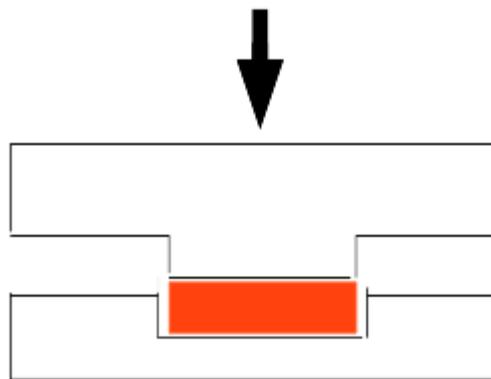


Abb. 11: Schematische Darstellung der Probenkammer mit Bandscheibenzylinder (orange, 6 mm im Durchmesser) und Kraftvektor.

Zunächst wurde eine leere Probenkammer als Referenz eingelegt und das Kompressionselement langsam an die Kammer herangefahren, bis die Druckfeder einen Widerstand registrierte. Diese Position wurde als Nullpunkt definiert.

Anschließend wurde der Bandscheibenzylinder in die Probenkammer eingelegt und wiederum mit dem Kompressionselement an die Kammer herangefahren bis die Druckfeder einen Widerstand registrierte, diese Höhe wurde als Probenhöhe definiert.

Aus diesen zwei Messpunkten konnte eine Belastung nach gewünschtem Protokoll durchgeführt werden. In dieser Studie wurden die Zylinder auf 50 % ihrer Ursprungshöhe innerhalb 1 s komprimiert und in dieser einen Sekunde auch wieder entlastet.

Die Software erstellte automatisch in einem Diagramm eine Kurve von aufgebrachtener Kraft und Gegenkraft durch die Probe. Wobei die „ideale“ Kurve und somit die „ideale“ verwendete Kraft durch eine Parabel dargestellt werden sollte.

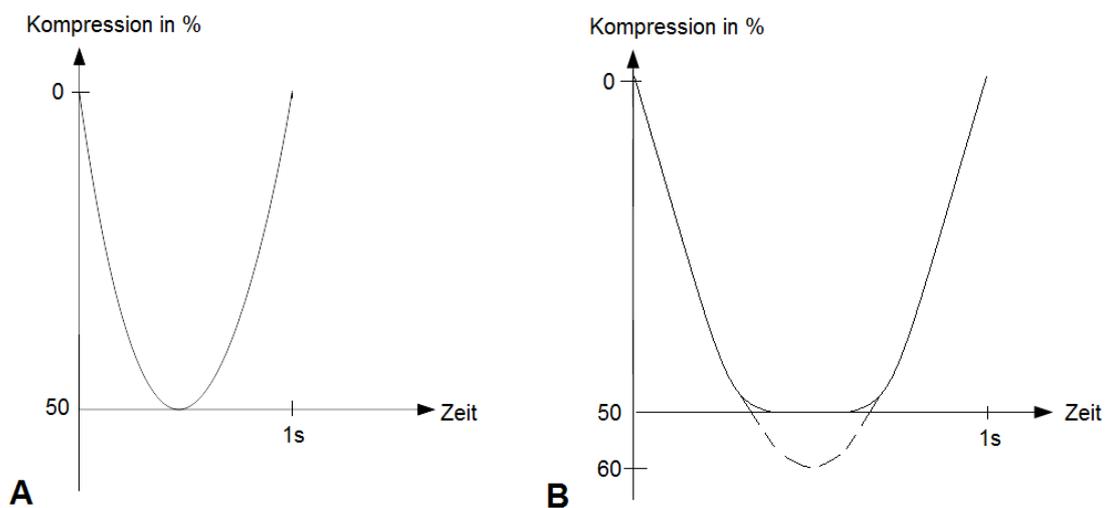


Abb. 12: Kompressionskurven der Bandscheibenprobe in der Belastungsmaschine. **(A)** Das Schaubild zeigt einen idealen Kurvenverlauf mit 50 % Kompression der Probe, der Kurvenendpunkt wird nach 1 s erreicht bzw. **(B)** einen nicht idealen Kurvenverlauf (durchgängige Linie) mit > 50 % Kompression der Probe, der Kurvenendpunkt wird auch hier nach 1 s erreicht. Die gestrichelte Linie wurde als Hilfslinie dargestellt, um die Kompression > 50 % nochmals zu verdeutlichen.

2.2.3 Life/Dead-Zellfärbung

In dieser Arbeit soll die Überlebensfähigkeit der Chondrozyten des Annulus fibrosus vergleichend bei unbelasteten und belasteten Gewebeproben dargestellt werden. Hierfür wurde eine Kombination an fluoreszierenden

Farbstoffen ausgewählt, welche die lebenden und die toten Zellen jeweils in einem anderen Farbspektrum darstellt. Zunächst wurde die Kombination von Propidium-Iodid und Calcein-Acetoxy-methylester getestet. Propidium-Iodid färbt die Nukleinsäure und kann nur durch die Zellmembran toter Zellen hindurchdiffundieren. Calcein-Acetoxy-methylester ist Zellmembran-permeabel und leuchtet selbst nicht, reagiert allerdings mit der Esterase in lebenden Zellen wobei Calcein entsteht, welches unter Fluoreszenzlicht leuchtet. Beide Farbstoffe stammen aus dem Roche „Cell Viability Imaging Kit“. Propidium-Iodid besitzt ein Exzitationsmaximum, welches im Bereich von 535 nm liegt. Das Emissionsmaximum von Propidium-Iodid liegt bei 617 nm (siehe Abb. 13 A). Bei Calcein befindet sich das Exzitationsmaximum bei 490 nm und das Emissionsmaximum bei 515 nm. Vermutlich aufgrund der Nähe der beiden Exzitationsmaxima, wurde bei der Etablierung des Protokolls festgestellt, dass der Farbstoff Propidium-Iodid auch bei niedrigeren Wellenlängen leuchtet und somit nicht deutlich von Calcein zu unterscheiden ist. Daher entschied man sich beim Farbstoff für die lebenden Zellen für den Celltracker™ Blue CMAC von life technologies™. Dieser besitzt ein Exzitationsmaximum von 353 nm und ein Emissionsmaximum von 466 nm (siehe Abb. 13 B). Der Celltracker kann die Zellmembran lebender Zellen überwinden, dort entstehen nicht Zellmembran-permeable Reaktionsprodukte. Sichtbar bleibt die Färbung mit dem Celltracker für maximal 72 h.

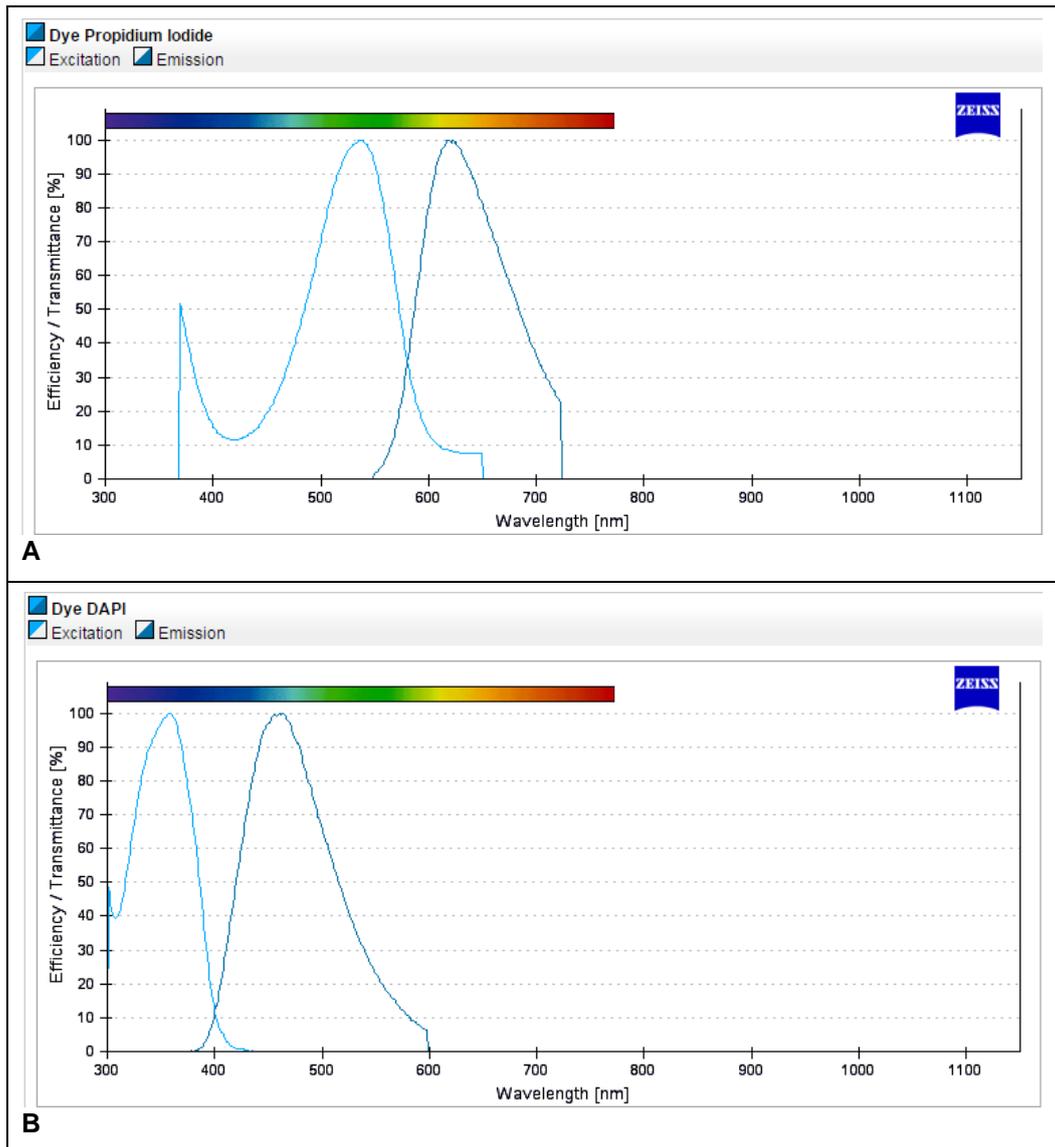


Abb. 13: Emissions- und Exzitationskurven der verwendeten Farbstoffe zur Färbung lebender und toter Zellen. **(A)** Emissions- und Exzitationskurve von Propidium-Iodid, **(B)** Emissions- und Exzitationskurve von DAPI, das Emissions- und Exzitationsmaximum ähnelt dem des hier verwendeten Celltrackers CMAC. Mit Erlaubnis von Carl Zeiss Microimaging GmbH, 07740 Jena.

Die Zellen eines belasteten und eines unbelasteten Bandscheibenzylinders (als Referenz) wurden 24 h nach der Belastung in 150 µl Kulturmedium mit 50 µl Propidium-Iodid und 0,2 µl Celltracker für 8 - 10 h im Inkubator bei 37° Celsius und 5 % CO₂ gefärbt. Es wurde stets darauf geachtet, dass die Farbstoffe nicht zu viel Licht ausgesetzt waren, da sie ansonsten ausbleichen.

2.2.4 Anfertigen von Kryoschnitten

Nachdem die Zellen des Bandscheibenzyinders ausreichend lange gefärbt worden waren, wurden Gefrierschnitte der Zylinder möglichst lichtgeschützt angefertigt. Das bovine Gewebe wurde aufgrund der im Vergleich mit dem degenerierten humanen Gewebe dicht gepackteren Kollagenfasern 40 µm dick geschnitten, während das humane Gewebe 70 µm dick geschnitten werden konnte. Der dichtere Kollagenfaserapparat im bovinen Gewebe hängt einmal damit zusammen, dass das verwendete Rindergewebe von gesunden, jungen Tieren stammt. Zudem ist die Last, die auf die Rinderbandscheibe in der Lendenwirbelsäule wirkt, höher einzuschätzen als die Last, die auf die humane Lendenwirbelsäule und somit die humanen Bandscheiben wirkt (siehe Abschnitt Verwendung tierischen Materials). Bei Tests mit 100 µm dick geschnittenem Rindergewebe wurde vor allem die anschließend gefärbte perizelluläre Matrix deutlich schlechter bzw. gar nicht angefärbt.

Um die Gefrierschnitte herstellen zu können, wurden die Gewebezyylinder in TissueTek, ein Medium zur Einbettung von Proben, welches bei den im Kryotom herrschenden - 21° Celsius fest wird, auf Metallscheiben eingebettet.

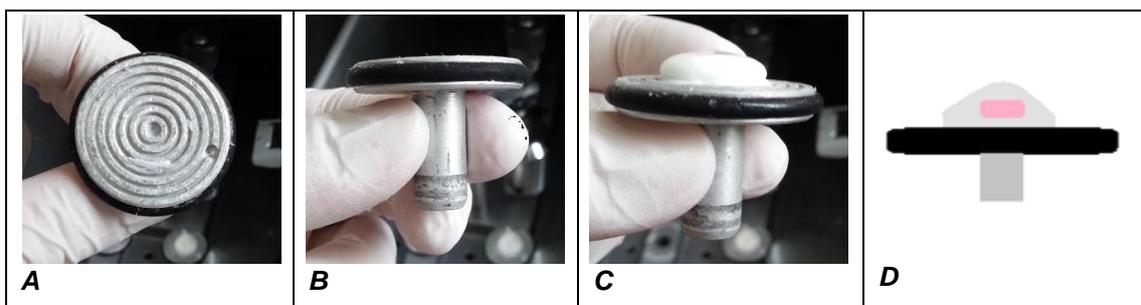


Abb. 14: Metallscheibe welche im Kryotom verwendet wird zur Einbettung der Probe in TissueTek **(A)** von oben; **(B)** von der Seite; **(C)** mit eingebettetem Bandscheibenzyylinder in TissueTek (weiss); **(D)** schematische Darstellung des eingebetteten Bandscheibenzyinders (rosa) in TissueTek (grau).

Der Sockel der Metallscheibe wird dann in eine extra dafür vorgesehene

Vorrichtung gesteckt und dort arretiert. Das Kryotom wird manuell betätigt, wodurch die Probe sich in der eingestellten Schnittdicke zur Kryotomklinge hin auf- und ab bewegt. Die fertigen Schnitte werden dann unter einer Glasscheibe aufgefangen und können nach Beenden des Schneidens eingesammelt und in PBT gegeben werden. Dabei wird das TissueTek von den Schnitten gewaschen. Das PBT wurde anschließend dreimal im 5 min - Takt ausgetauscht. Während des Waschvorgangs wurden die Schnitte in einem Probenröhrchen (BlueCap) auf dem Rüttler unter schonender Bewegung gelagert. Die Schnitte konnten im Anschluss daran auf einen Objektträger aufgetragen werden, um eine Fluoreszenzaufnahme der Zellen zu ermöglichen.

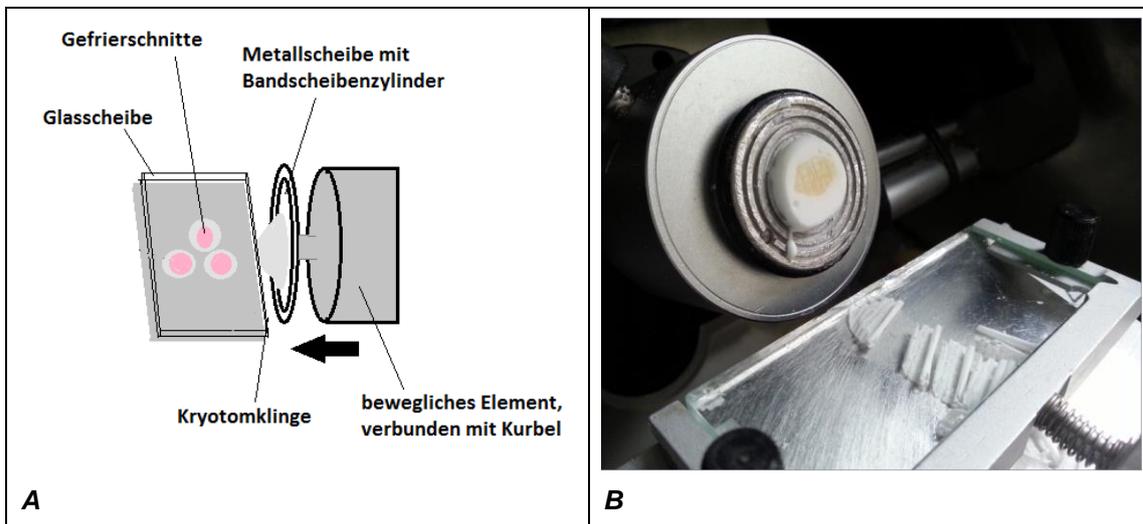


Abb. 15: Schneidevorgang mit dem Kryotom (A) schematisch; (B) mit dem Kryotom im Siegfried-Weller-Institut, Waldhörnlestraße 22, 72072 Tübingen.

2.2.5 Färbung der Perizellulären Matrix

Die Etablierung des Färbeprotokolls der perizellulären Matrix erfolgte mit bovinem Bandscheibengewebe.

Zunächst wurde ein Protokoll verwendet, welches bereits bei mit 4 % PFA (= Paraformaldehyd) fixierten Schnitten eingesetzt worden war. Hierbei wurden die

Schnitte mit einer Dicke von 100 µm nach dem Schneiden am Kryotom in ein Eppendorf-Röhrchen gegeben, sodass dort alle weiteren Schritte durchgeführt werden konnten.

Nachdem die Schnitte gut vom restlichen TissueTek gereinigt waren, wurde für 5 min 1 % SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) ein anionisches Tensid, zu den 4 - 5 Schnitten pro Eppendorf-Röhrchen hinzugegeben.

Im nächsten Schritt dieses Protokolls wurden die Schnitte wieder dreimal für jeweils 5min mit PBT gewaschen. Im Anschluss daran wurde Eselserum in einer Verdünnung von 1 : 100 mit PBT (990 µl PBT + 10 µl Eselserum) für 15 min auf den Schnitt gegeben. Dies dient der Blockierung nicht-spezifischer Interaktionen zwischen Gewebe und Immunglobulinen.

Nach diesen 15 min konnte der erste Antikörper, Col-VIA3, in einer Konzentration von 1 : 200 (1,5 µl AK + 300 µl PBT) auf die Schnitte gegeben werden. Die Schnitte wurden dann über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Rüttler gelagert.

Am nächsten Tag konnte überschüssige Flüssigkeit entfernt werden und nach dreimaligem Waschen mit PBT für jeweils 5 min, wurde der zweite Antikörper, FITC, wiederum in einer Konzentration von 1 : 200 (1,5 µl AK + 300 µl PBT) auf die Schnitte gegeben. Dieser Schritt wurde im Dunkeln durchgeführt, damit der Farbstoff nicht ausbleicht. Nach weiterer Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Rüttler in abgedunkelter Umgebung konnten die Schnitte am Folgetag auf einen Objektträger gelegt werden, wo sie mit DAKO Fluorescent Mounting Medium eingebettet wurden und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden konnten.

Eine direkte Übertragbarkeit des etablierten Protokolls auf die unfixierten lebenden Gewebeproben war jedoch nicht möglich.

Bereits bei der Bearbeitung im Röhrchen fiel makroskopisch auf, dass die angefertigten Schnitte dazu neigten aufzufasern, ein Umstand, der sich auch später mikroskopisch bestätigte. Hier konnte zudem festgestellt werden, dass die Zellen ihre charakteristisch rundliche Form verloren hatten und sich diffus und ohne scharfe Randbegrenzung darstellten, was mit einem Aufplatzen der Zellen vereinbar wäre. Dies würde erklärt werden durch die Tensidwirkung des

SDS, welches die aus zwei Lagen bestehende amphiphile Phospholipidschicht der Zellmembran aufbricht. Zudem zeigte sich die Färbung der PZM für eine statistische Auswertung nicht ausreichend genug ausgeprägt.

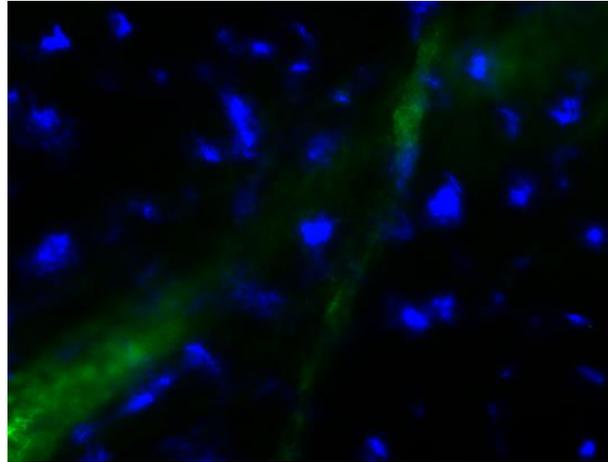


Abb. 16: Geplatzte Zellen durch SDS 1 %, 10 x Vergrößerung, DAPI-Zellkernfärbung

Zunächst wurde das gleiche Protokoll nochmals ohne SDS Schritt für Schritt versucht. Hier wurden die Zellen nicht zerstört. Im Zentrum der Präparate mit 100 µm Schnittdicke war keine Abgrenzung der perizellulären Matrix möglich, allerdings zeigten sich in den Randzonen der Präparate einzelne Zellen, bei denen sich die perizelluläre Matrix, wenn auch unscharf, darstellte.

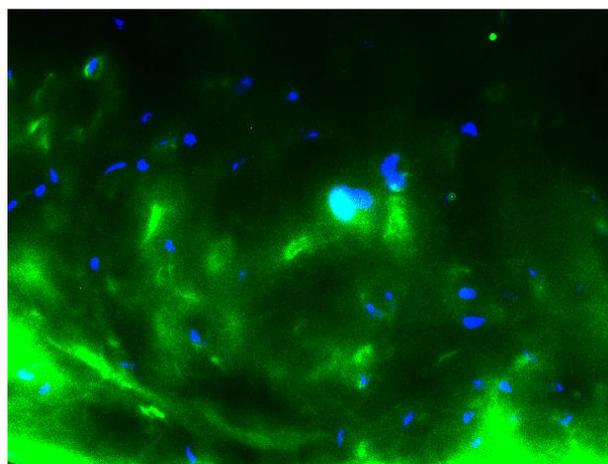


Abb. 17: Perizelluläre Matrix mit Col-VIA3 unscharf angefärbt (grün), DAPI-Zellkernfärbung (blau), 20 x Vergrößerung

Daher erfolgte unter der Überlegung das Gewebe für die Antikörper zugänglicher zu machen in einem nächsten Protokoll ein kontrollierter Kollagenverdau mittels Kollagenase A in verschiedenen Konzentrationen unterschiedlich lang bei 37° Celsius im Thermomixer:

Tabelle 9: Getestete Enzymkonzentrationen beim Verdau mit Kollagenase A

Enzymkonzentration	tatsächliche Enzymkonzentration	Expositionszeit	Ergebnis Rind 6	Ergebnis Rind 7
500 µl PBT + 13,5 µl Kollagenase A (10 mg/ml) (Ausgangskonzentration aus ursprünglichem Protokoll für fixierte Schnitte)	In 13,5 µl sind 0,135 mg = 135 µg Kollagenase A, somit sind im Gesamtvolumen (513,5 µl) 0,26 µg/µl	1 min	Gewebestruktur der Schnitte völlig zerstört.	
		5 min		
		10 min		
500 µl PBT + 7,25 µl Kollagenase A (10 mg/ml) (1 : 2 der Ausgangskonzentration)	0,075 mg = 75 µg Kollagenase A, somit sind im Gesamtvolumen (507,25 µl) 0,15 µg/µl	1 min	Kreisform z.T. noch erhalten, am Rand stark angedaut, Faserstruktur aufgebrochen	Gewebestruktur der Schnitte völlig zerstört.
		5 min	Gewebestruktur aufgebrochen, Form noch erkennbar	
500 µl PBT + 2,7 µl Kollagenase A (10 mg/ml) (1 : 5 der Ausgangskonzentration)	0,027 mg = 27 µg Kollagenase A, somit sind im Gesamtvolumen (502,7 µl) 0,05 µg/µl	1 min	Kreisform noch vorhanden, am Rand stark angedaut, Gewebestruktur aufgebrochen	Gewebestruktur der Schnitte völlig zerstört.
		1 min	Gewebestruktur weitgehend aufgebrochen, Ursprungsform nicht erkennbar	
500 µl PBT + 1,35 µl Kollagenase A (10 mg/ml) (1 : 10 der Ausgangskonzentration)	0,0135 mg = 13,5 µg Kollagenase A, somit sind im Gesamtvolumen (501,35 µl) 0,03 µg/µl	1 min	aufgelockerte Gewebestruktur (SDS?)	Gewebestruktur der Schnitte völlig zerstört.
		5 min	stark aufgelockerte Gewebestruktur (SDS?)	
500 µl PBT + 0,135 µl Kollagenase A (10 mg/ml) (1 : 100 der Ausgangskonzentration)	0,00135 mg = 1,35 µg Kollagenase A, somit sind im Gesamtvolumen (500,135 µl) 0,003 µg/µl	1 min	Aufgelockerte Gewebestruktur (SDS?)	Gewebestruktur der Schnitte völlig zerstört.
		5 min	Stark aufgelockerte Gewebestruktur (SDS?)	Gewebestruktur der Schnitte weitgehend zerstört.
473 µl PBT + 27 µl Kollagenase A (0,01 mg/ml) (1 : 500 der Ausgangskonzentration)	0,27 µg Kollagenase A sind somit im Gesamtvolumen (500 µl) 0,0005 µg/µl	1 min	Gewebestruktur z.T. etwas aufgebrochen, größtenteils erhalten	Gewebestruktur der Schnitte völlig zerstört.
		5 min		

Enzymkonzentration	tatsächliche Enzymkonzentration	Expositionszeit	Ergebnis Rind 6	Ergebnis Rind 7
486,5 µl PBT + 13,5 µl Kollagenase A (0,01 mg/ml) (1 : 1000 der Ausgangskonzentration)	0,135 µg Kollagenase A sind somit im Gesamtvolumen (500 µl) 0,0003 µg/µl	1 min	Gewebestruktur erhalten	Gewebestruktur der Schnitte weitgehend zerstört.
		5 min	Gewebestruktur etwas aufgelockert	Gewebestruktur der Schnitte völlig zerstört.

Table 9 zeigt das Mischverhältnis von PBT und Enzym, die tatsächliche Enzymkonzentration, die Expositionszeit, sowie das Ergebnis des Kollagenase-Verdau im bovinen Bandscheibengewebe bei zwei Rindern (Rind 6 und Rind 7).

Die Annulus fibrosus-Schnitte der beiden Testrinder zeigten verschieden ausgeprägte Veränderungen auf den Verdau. Während bei Rind 7 die Gewebestruktur größtenteils völlig zerstört wurde, war bei Rind 6 zumeist eine aufgelockerte Gewebestruktur mit noch erhaltener Kreisform zu beobachten. Da insgesamt die Gewebestruktur der Schnitte allerdings in allen Fällen deutlich angegriffen war, wurden die Schnitte bei der weiteren Färbung im Eppendorf-Röhrchen durch die Belastungen des ständigen Flüssigkeitswechsels und Schüttelns weitgehend zerstört, wodurch die perizelluläre Matrix wiederum nicht dargestellt werden konnte.

Eine positive Beeinflussung durch die Wahl dünnerer Schnitte oder die Verwendung von PBS anstelle PBT war ebenfalls nicht zu erreichen.

Es wurde daher versucht, die Schnitte direkt auf dem Objektträger anzufärben. Hierfür wurden die 80 µm Schnitte nach dem Schneiden mit dem Kryotom und dem dreimaligen Waschen für jeweils 5 min mit PBT direkt auf den Objektträger gelegt. Nachdem eine Fluoreszenzaufnahme der Zellen mit den Lebend-Tot-Farbstoffen erfolgt war, wurde um den auf dem Objektträger aufliegenden Schnitt mit einem sogenannten „PapPen“ ein Kreis gezogen. Dieser PapPen ist lipophil, daher können auf den Schnitt pipettierte Flüssigkeiten, welche hydrophil sind, darin eingeschlossen werden.

Anschließend wurde Eselserum in einer Verdünnung 1 : 100 mit PBT (10 µl Donkey Serum + 990 µl PBT) für 15 min auf den Schnitt gegeben. Dann konnte

der erste Antikörper Col-VIA3 in einer Konzentration 1 : 50 (0,6 µl Antikörper + 30 µl PBT) auf den Schnitt gegeben werden (Herstellerempfehlung: Konzentration von 1 : 50 bis 1 : 500). Der Objektträger wurde dann über mindestens 16 h in einer selbst angefertigten luftdicht verschlossenen Feuchtbox im Kühlschrank gelagert. Nach dieser Inkubationszeit wurde wiederum überstehende Flüssigkeit entfernt und der Schnitt dreimal mit PBT über jeweils 5 min gewaschen. Anschließend konnte der zweite Antikörper FITC in einer 1 : 100 Konzentration (0,3 µl Antikörper + 30 µl PBT) auf den Schnitt pipettiert werden (Herstellerempfehlung: Konzentration zwischen 1 : 100 bis 1 : 400). Der Antikörper wurde wiederum für mindestens 16 h im Kühlschrank in der luftdichten Feuchtbox gelagert.

In einem weiteren Schritt wurde dann die optimale Schnittdicke evaluiert. Schnitte einer Dicke von 30 µm - 100 µm in Zehnerschritten wurden verglichen, eine Schnittdicke von 40 µm zeigte die besten Ergebnisse.

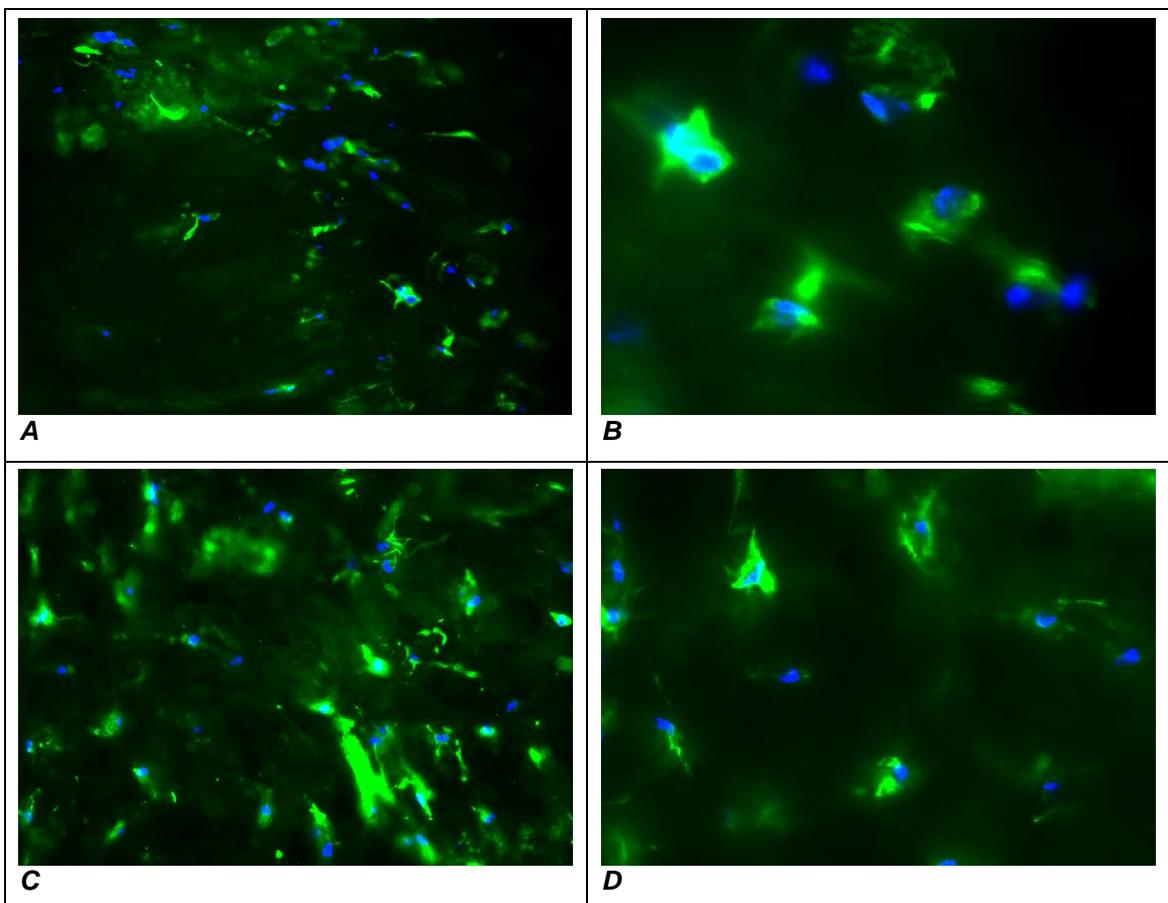


Abb. 18: Darstellung der perizellulären Matrix im bovinen Gewebe, Färbung (PZM + Zellkern) auf dem Objektträger, Col-VIA3-PZM-Färbung (grün), DAPI-Zellkernfärbung (blau); **(A)** 10 x Vergrößerung und 80 µm Schnittdicke, **(B)** 20 x Vergrößerung und 80 µm Schnittdicke, **(C)** 10 x Vergrößerung und 40 µm Schnittdicke, **(D)** 20 x Vergrößerung und 40 µm Schnittdicke.

Ein Verdau mit Kollagenase A in der Verdünnung 1 : 1000 direkt auf dem Objektträger war ebenfalls erfolgreich und stellte die Matrix auch dickerer Schnitte gut dar. Allerdings kam der Verdau im abschließenden Protokoll nicht zur Verwendung, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass ein Verdau mittels Kollagenase A die Eigenschaften der Zelle und ihr Verhalten bezüglich Apoptose unmittelbar beeinflusst.

Für die Schnitte des humanen Bandscheibengewebes wurde das am bovinen Bandscheibengewebe etablierte Protokoll verwendet. Allerdings erlaubte die lockerere Struktur des humanen Gewebes eine Schnittdicke von 70 µm, unter Beibehaltung einer leistungsfähigen und spezifischen Färbung der PZM.

2.2.6 Fluoreszenzmikroskopie

Die Darstellung der Zellen und der PZM erfolgte in dieser Arbeit mittels Fluoreszenzmikroskopie. Verwendet wurde das Fluoreszenzmikroskop Observer Z1 von Carl Zeiss und die dazugehörige Software Axio Vision Release 4.8.

Die verwendeten Farbstoffe sind Fluorophore, Moleküle mit fluoreszierenden Eigenschaften, welche es ermöglichen zelluläre, subzelluläre oder auch molekulare Komponenten darzustellen⁴³.

Abhängig vom Emissionsspektrum wurden die Farbstoffe mit unterschiedlichen Filtern sichtbar gemacht. Der Lebendfarbstoff Celltracker blue, sowie auch der alle Zellen anfärbende Farbstoff DAPI, konnten mit dem gleichen, sogenannten DAPI-Filter dargestellt werden und leuchteten blau. Der Farbstoff Propidium-Iodid, welcher verwendet wurde, um die toten Zellen anzufärben, leuchtete mit

dem DsRed-Filter für das Auge rot und der 2. AK FITC mit dem die perizelluläre Matrix sichtbar gemacht wurde, leuchtete mit dem FITC-Filter grün.

Diese drei Filter sind in einen würfelförmigen Filterhalter eingebaut. Der Würfel befindet sich in einer Art Karussell, wobei hier zwischen drei und neun solcher Würfel Platz finden können. Die Würfel wurden dann computergesteuert in Position gebracht⁴³.

Das Objektiv eines Fluoreszenzmikroskops ist beides, eine Lichtquelle, welche die Fluoreszenz von Proben anregt und ein optisches Element, welches die emittierte Fluoreszenz wieder einfängt. Als Lichtquelle wurde eine Xenon-Bogenlampe verwendet, da diese die notwendige Intensität aufbringt⁴³.

2.2.8 Fluoreszenzaufnahmen der Zellen

Wie oben bereits beschrieben, wurde 24 h nach der Belastung eine Zellaufnahme angefertigt. Die Schnitte wurden hierzu auf den Objektträger gelegt und während der Aufnahme feucht gehalten. Über die Software Axio Vision Release 4.8 wurden dann sogenannte Mosaik-Aufnahmen gemacht. Diese Aufnahme besteht aus mehreren Einzelbildern, welche die Software Axio Vision Release 4.8 zu einem Gesamtbild zusammenfügen kann. Hiermit kann ein größerer Teil eines Schnittes am Stück dargestellt werden. Die Aufnahmen erfolgten in 10 x Vergrößerung.

Eine Aufnahme vor Anfärbung der perizellulären Matrix wurde daher angefertigt, da die Celltracker-Färbung nach ca. 48 h nicht mehr sichtbar war. Das Protokoll zur Anfärbung der PZM dauerte jedoch mindestens 40h, somit wären die lebenden Zellen nach der PZM-Anfärbung nicht mehr sichtbar gewesen.

Zu beachten ist, dass einige der zu Beginn der Zellfärbung noch lebenden Zellen – womöglich als Folge des operativen Traumas – im Laufe der Färbung starben und somit deren Zellmembran auch für Propidium-Iodid durchgängig wurde. Diese Zellen emittierten dann sowohl die erregenden Wellenlängen des

Lebendmarkers Celltracker wie auch der Totfärbung des Propidium-Iodids (in der Auswertung zählten diese Zellen zu den Lebenden):

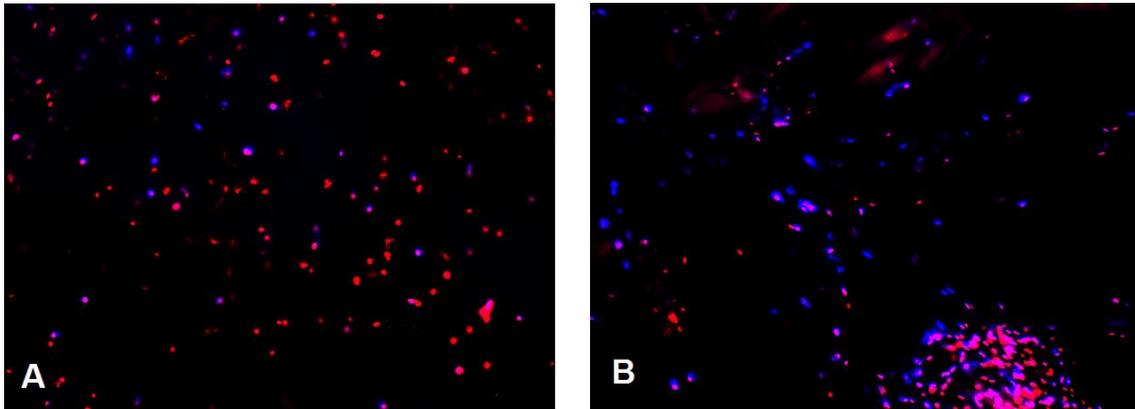


Abb. 19: Lebend-Tot-Fluoreszenzaufnahme **(A)** der bovinen Bandscheibe und **(B)** der humanen Bandscheibe mit den Farbstoffen Celltracker (blau, lebende Zellen) und Propidium-Iodid (rot, tote Zellen) in 10 x Vergrößerung, einige der Zellen leuchten blau und rot, diese wurden als lebend gewertet.

2.2.9 Fluoreszenzaufnahmen der Perizellulären Matrix

Die perizelluläre Matrix wurde stets am selben Schnitt angefärbt, bei welchem zuvor bereits die Zellen fotografiert worden waren. Die Matrix wurde zunächst mit dem primären Antikörper Col-VIA3 angefärbt, welcher die Col-VIA3-Epitope der perizellulären Matrix besetzen sollte. Nachdem der Antikörper über Nacht auf dem Schnitt belassen wurde, konnte am nächsten Tag überstehende Flüssigkeit entfernt und der sekundäre Antikörper FITC ebenfalls über Nacht auf die Probe gegeben werden. Dieser sekundäre Antikörper dockt sich an das Fc-Fragment des primären Antikörpers und agiert als Fluorophor. Somit konnte nach der Färbung der perizellulären Matrix nochmals eine Mosaikaufnahme des Schnittes gemacht werden. Zusätzlich mit dem sekundären Antikörper wurde DAPI, eine Zellkernfärbung aller Zellen, zur Färbelösung mit hinzugegeben um weiterhin alle Zellen sichtbar zu machen und die PZM zuordnen zu können.

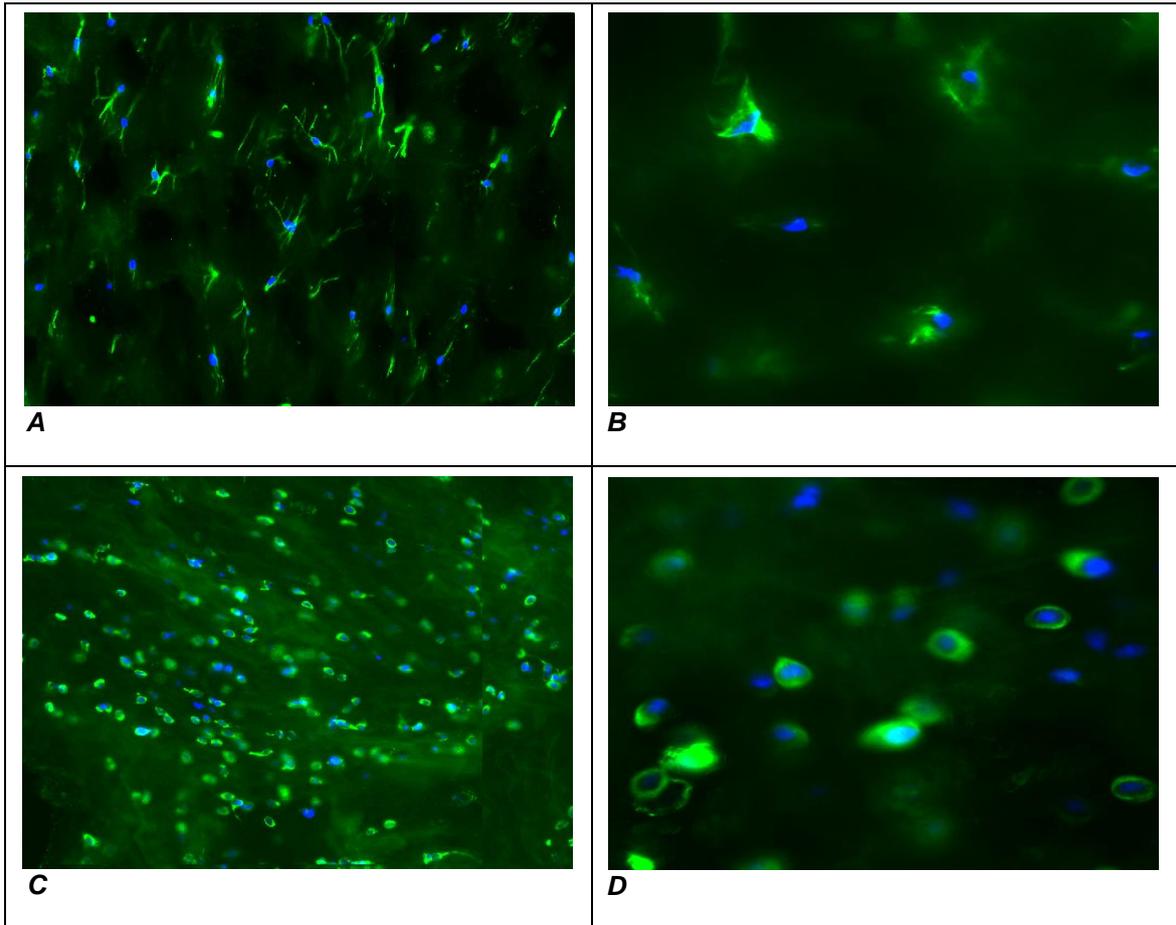


Abb. 20: Darstellung der perizellulären Matrix in **(A,B)** bovinem Gewebe und in **(C,D)** humanem Gewebe, **(A,B)** 40 μm , **(C,D)** 70 μm ; Col-VIA3-Färbung der PZM (grün), DAPI-Zellkernfärbung (blau), **(A,C)** 10 x Vergrößerung und **(B,D)** 20 x Vergrößerung.

2.2.10 Auswertung der Gewebeproben

In einer Excel-Tabelle wurden für jede untersuchte Bandscheibe diverse Daten pseudonymisiert zu Patient und Bandscheibe gesammelt. Dokumentiert wurden Alter, Geschlecht, Diagnose, Symptombdauer, Bandscheibenfach, OP-Datum, OP-Verfahren und eine mögliche entzündungshemmende präoperative Medikation wie beispielsweise Corticosteroide. Neben diesen patientenspezifischen Daten wurde das Bandscheibengewebe makroskopisch beurteilt nach Haptik. Hierbei wurde differenziert zwischen Grad 1 mit elastischem und überdurchschnittlich gutem Gewebe am Stück, Grad 2 mit weniger elastischem und aufgefaserter Gewebe und Grad 3, welcher für weiches, strukturarmes und unterdurchschnittliches Gewebe stand.

Später wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop zusätzlich die mikroskopische Gewebedichte beurteilt und wiederum unterteilt in sehr kompakt, mäßig und locker fasrig.

Anhand vorliegender MRT-Bilder (Beurteilung in der T2-Wichtung) wurde der Pfirrmann-Score bestimmt (siehe Abb. 21⁴⁴). Dieser Score ist ordinal skaliert von 1 - 5, wobei Grad 1 eine normale gesunde Bandscheibe beschreibt, deren Struktur in der MRT homogen ist, mit heller hyperintenser weißer Signalintensität des Nucleus und normaler Bandscheibenhöhe. Grad 2 steht für eine inhomogene Struktur der Bandscheibe mit einem hyperintensiven weißen Signal des Nucleus, wodurch die Differenzierung von Nucleus und Annulus gegeben ist. Die Bandscheibenhöhe ist normal, die Bandscheibe kann graue horizontale Banden aufweisen. Ebenfalls eine inhomogene Struktur der Bandscheibe weist Grad 3 auf, mit mittlerer grauer Signalintensität des Nucleus. Die Differenzierung zwischen Nucleus und Annulus wird dadurch weniger deutlich, die Bandscheibenhöhe kann normal bis leicht erniedrigt sein. Die inhomogene Bandscheibenstruktur von Grad 4 weist eine hypointense dunkelgraue Signalintensität des Nucleus auf, wodurch die Abgrenzung zwischen Nucleus und Annulus komplett verloren geht. Die Bandscheibenhöhe kann noch normal hoch sein bis moderat erniedrigt. Grad 5 beschreibt schlussendlich eine inhomogene Bandscheibenstruktur mit einer hypointensen

schwarzen Signalintensität des Nucleus. Der Nucleus kann somit nicht mehr vom Annulus differenziert werden und die Bandscheibenhöhe ist drastisch reduziert.⁴⁴

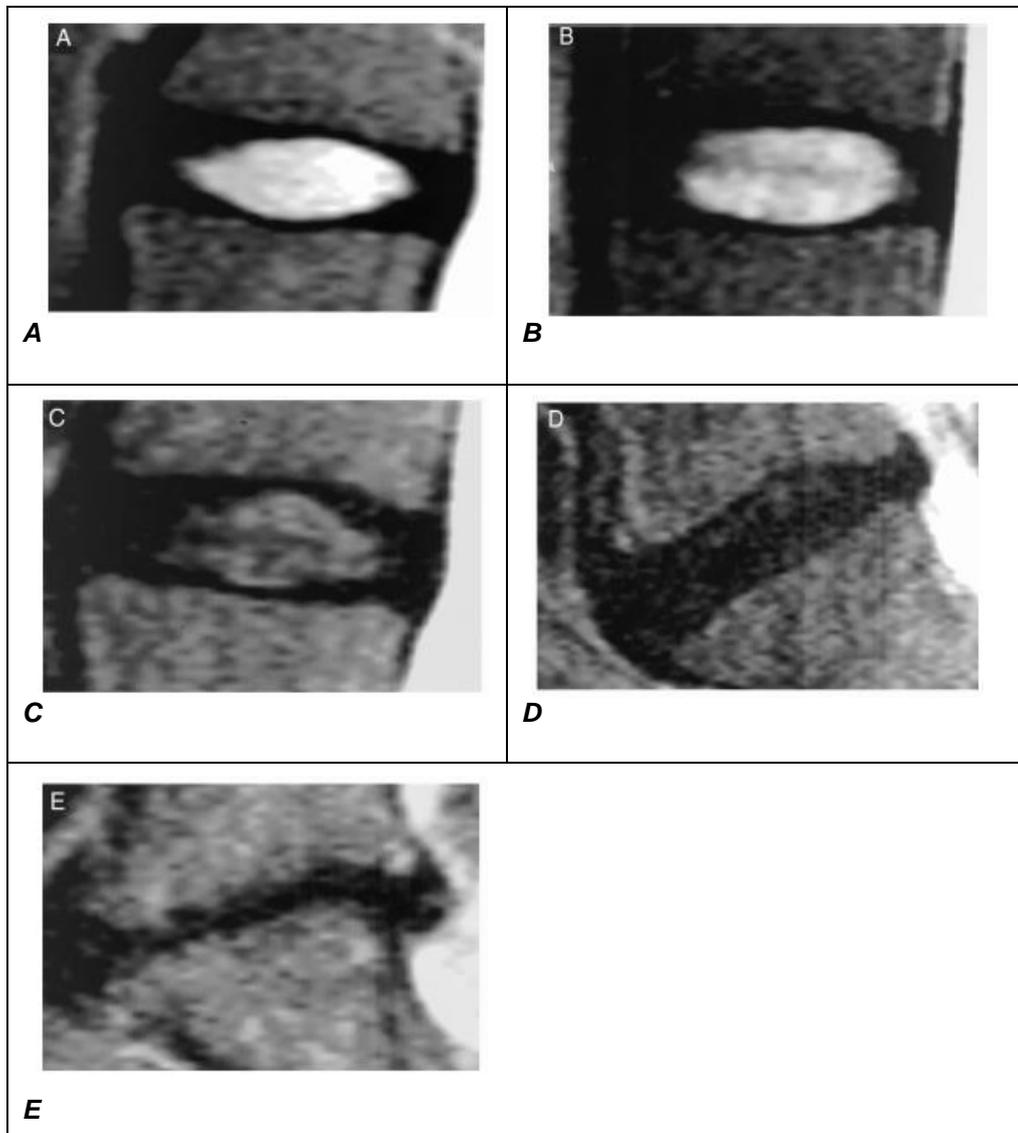


Abb. 21 A - E: Die MRT-Bilder zeigen in alphabetischer Reihenfolge die Grade 1 - 5 des Pfirrmann-Scores. MRT-Bilder von Pfirrmann et al. mit Genehmigung⁴⁴.

Anhand des Pfirrmann-Scores, der Anamnese und des konventionellen Röntgen-Bildes wurde das Gewebe abschlusskategorisiert in Traumagewebe, Gewebe eines akuten bzw. chronischen Bandscheibenvorfalls und Gewebe

mäßiger bzw. ausgeprägter Degeneration.

Erfasst wurde zudem die Probenhöhe der belasteten Zylinder.

Die mikroskopische Auswertung der Gewebeproben erfolgte verblindet anhand der Fluoreszenzaufnahmen mit dem Programm AxioVision von Zeiss.

Zunächst wurde die Aufnahme des Schnittes mit der Lebend-/Tot-Färbung ausgewertet. Willkürlich wurden pro Schnitt zwei Felder von ca. 500 µm x 500 µm gewählt und darin die lebenden und die toten Zellen ausgezählt und dokumentiert. Bei doppelter Färbung einer Zelle mit dem Lebend- und dem Totfarbstoff, wurde die Zelle zu den lebenden Zellen gerechnet. Um nun die perizelluläre Matrix der lebenden und toten Zellen bestimmen zu können, wurde die Aufnahme desselben Schnittes mit der Col-VIA3 und DAPI-Färbung herangezogen. Hier wurden wieder dieselben Felder ausgewählt und die perizelluläre Matrix in drei Kategorien unterteilt nach dem Anteil der PZM welcher in der Färbung die Zelle umkleidet in Prozent. Kategorie 1 war hierbei eine Umkleidung mit perizellulärer Matrix von über 75% um die Zelle herum, Kategorie 2 von 25 - 75% und Kategorie 3 eine perizelluläre Matrix von weniger als 25% um die Zelle herum.

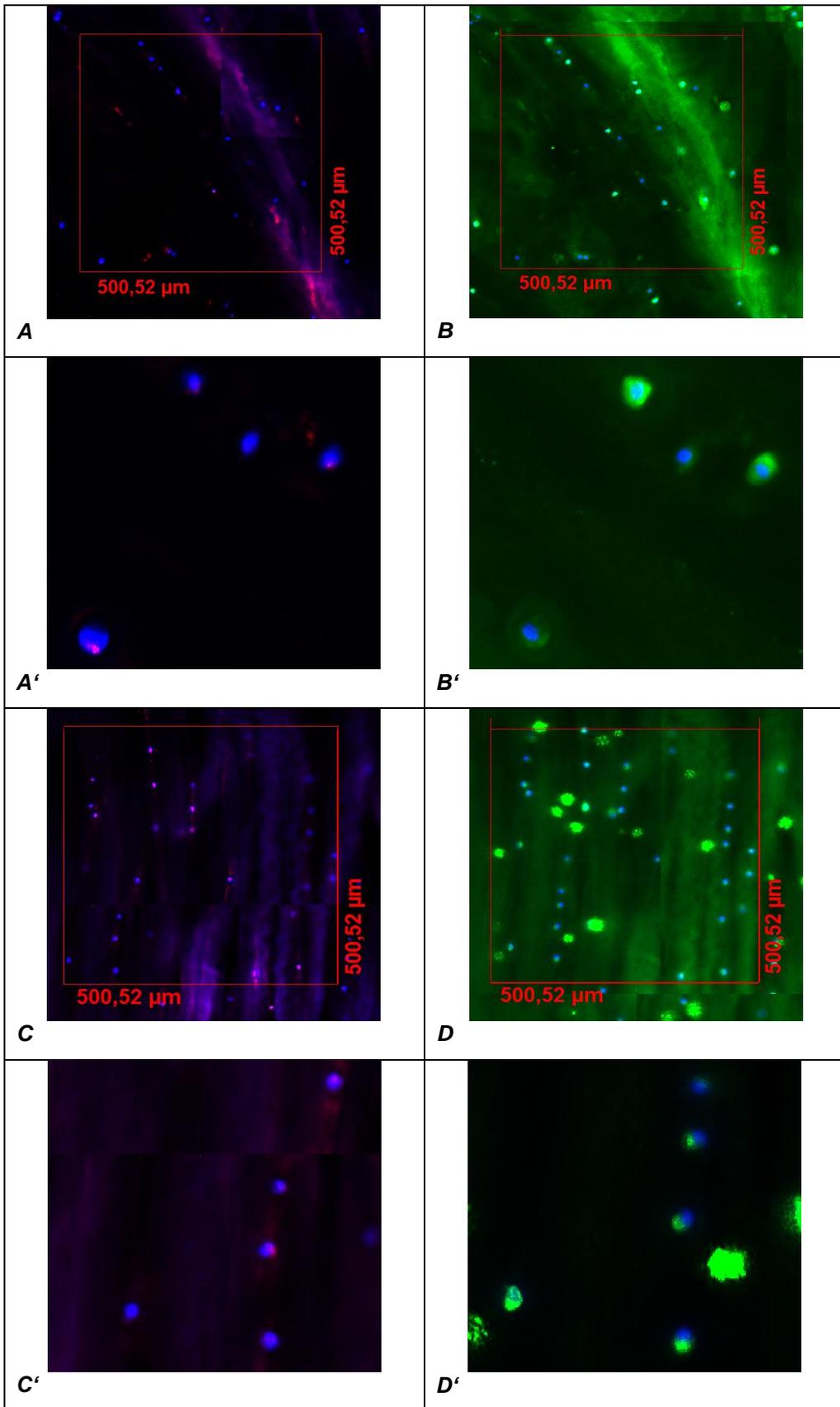


Abb. 22 Lebende und tote Zellen, sowie deren perizelluläre Matrix. Die Fluoreszenzaufnahme gefärbt mit Propidium-Iodid (rot, tote Zellen) und Cell-Tracker (blau, lebende Zellen) zeigt ein Auswertungsfeld eines unbelasteten Gewebezyllinders der Bandscheibe Nr. 14 (**A**) in 10 x Vergrößerung und (**A'**) in 20 x Vergrößerung bzw. der Bandscheibe Nr. 12 (**C**) in 10 x Vergrößerung und (**C'**) in 20 x Vergrößerung; Die Fluoreszenzaufnahme gefärbt mit DAPI (blau, alle Zellen) und Col-VIA3 (grün, perizelluläre Matrix) zeigt das selbe Auswertungsfeld wie Abb. A bzw. A' sowie C und C' eines unbelasteten Gewebezyllinders der Bandscheibe Nr. 14 (**B**) in 10 x Vergrößerung und (**B'**) in 20 x Vergrößerung bzw. der Bandscheibe Nr. 12 (**D**) in 10 x Vergrößerung und (**D'**) in 20 x Vergrößerung.

Neben diesen Faktoren wurden mikroskopisch die Zellmuster, in welchen sich die Chondrozyten im Knorpelgewebe organisieren, erfasst. Zusätzlich wurde die Zelldichte in den Zellmustern und die lebenden und toten Zellen pro Muster bestimmt. Unterteilt wurden die Muster in einzelne Zellen, Paare, strings (mindestens drei aneinander gereihete Zellen), double strings (zwei parallel nebeneinander liegende Strings), kleine Cluster (Zellhäufen aus bis zu acht Zellen), mittlere Cluster (Zellhaufen aus 8 - 25 Zellen) und große Cluster (Zellhaufen aus über 25 Zellen).

2.2.11 Statistische Auswertung

Normalverteilung der Variablen wurde anhand von Histogrammen überprüft (siehe Anhang). Normalverteilte Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben, nicht normalverteilte Daten als Median (Minimum - Maximum). Die graphische Darstellung erfolgt mittels Histogrammen für absolute und relative Häufigkeiten. Ergebnisse werden im Falle von Normalverteilung als Balkendiagramm, bei nicht-Normalverteilung in Form von Boxplots dargestellt. Unterschiede zwischen verschiedenen Variablen wurden wie folgt berechnet:

Der nicht parametrische Wilcoxon-Test wurde bei nicht normalverteilten Variablen verwendet bei zwei verbundenen Stichproben.

Eine einfaktorielle Varianzanalyse wurde bei Varianzhomogenität unabhängiger

und verbundener Stichproben mit einer unabhängigen und einer normalverteilten abhängigen Variable angewandt.

Bei nicht gegebener Varianzhomogenität und mehr als zwei unabhängigen Variablen, wurde ein nicht parametrischer Kruskal-Wallis-Test mit nachfolgender post-hoc Analyse bei unabhängigen Variablen mittels Mann-Whitney-U durchgeführt. Die abhängige Variable war jeweils nicht normalverteilt und mindestens ordinal skaliert.

Zur Korrelationsanalyse wurde bei normalverteilten Daten und einem linearen Zusammenhang der Variablen der Pearson-Korrelationskoeffizient verwendet. Bei nicht normalverteilten Daten und bzw. oder nicht linearem Zusammenhang der Variablen wurden die Rangkorrelationskoeffizienten Spearman-Rho und Kendall-Tau-b verwendet. Der Rangkorrelationskoeffizient Kendall-Tau-b wurde bei ordinalskalierten Daten bevorzugt.

P-Werte < 0,05 werden als statistisch signifikant gewertet.

Eine alpha-Adjustierung wurde nicht vorgenommen.

Zur Quantifizierung der perizellulären Matrix der Zellen für einen gesamten Gewebeabschnitt und um so einen Vergleich zwischen den Geweben zu ermöglichen, wurde folgende PZM-Hilfsvariable als gewichteter Mittelwert berechnet:

$$(0,75 \times \text{Zelldichte mit mehr als 75\% PZM} + 0,5 \times \text{Zelldichte mit PZM 25 - 75\%} + 0,25 \times \text{Zelldichte mit weniger als 25\% PZM}) / (\text{Zelldichte mit über 75\% PZM} + \text{Zelldichte mit PZM 25 - 75\%} + \text{Zelldichte mit weniger als 25\% PZM}) \times 100.$$

Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Statistikprogramms SPSS 22.

3 Ergebnisse

3.1 Datenanalyse der untersuchten Patienten

In die Studie eingeschlossen wurden 21, ausgewertet 20 Bandscheiben von 15 verschiedenen Patienten. Eine Bandscheibe konnte aufgrund mangelnder Gewebequalität nicht in die Wertung miteinbezogen werden (Bandscheibe 8/ Patient 7). Von Patient 8 wurden zwei, von den Patienten 11 und 15 jeweils drei Bandscheiben eingeschlossen. Allen anderen Patienten wurde jeweils eine Bandscheibe entnommen und diese untersucht. Tabelle 10 zeigt die Anzahl der tatsächlich ausgewerteten gestanzten Zylinder pro Bandscheibe, welche zufällig und jeweils in möglichst gleicher Anzahl belastet wurden bzw. unbelastet blieben.

Tabelle 10: humane Gewebeproben

Patienten-ID	Nummer der untersuchten Bandscheibe	Anzahl der insgesamt pro Bandscheibe gestanzten Zylinder, die ausgewertet wurden
1	Bandscheibe 1	2
2	Bandscheibe 2	2
3	Bandscheibe 3	2
4	Bandscheibe 4	2
5	Bandscheibe 5	4
6	Bandscheibe 6	9
7	Bandscheibe 7	9
	Bandscheibe 8	2
8	Bandscheibe 9	7
	Bandscheibe 10	7
9	Bandscheibe 11	4
10	Bandscheibe 12	14
11	Bandscheibe 13	4
	Bandscheibe 14	8
	Bandscheibe 15	2
12	Bandscheibe 16	6
13	Bandscheibe 17	6
14	Bandscheibe 18	4
15	Bandscheibe 19	6
	Bandscheibe 20	4
	Bandscheibe 21	2

Tabelle 10 zeigt die Anzahl an Patienten deren Bandscheibengewebe untersucht wurde. Jedem Patienten wurde eine ID zugeordnet, zudem wurde jede Bandscheibe nummeriert. Die Tabelle zeigt die Anzahl an gestanzten Zylindern pro Bandscheibe.

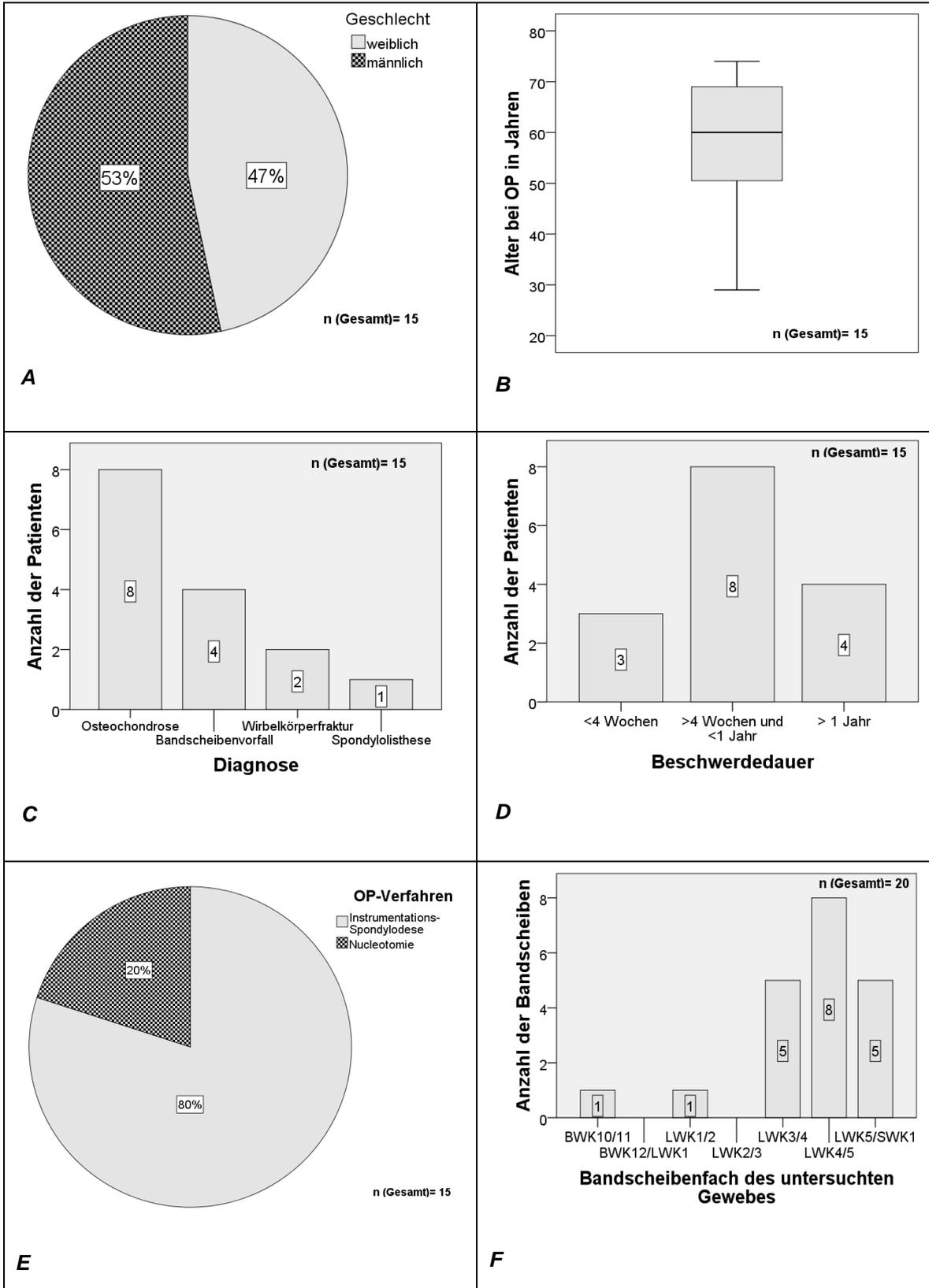


Abb. 23: Klinische Daten der untersuchten humanen Bandscheiben. **(A)** Das Kreisdiagramm zeigt die annähernd ausgewogene Geschlechterverteilung der humanen Patientenstichprobe, deren Bandscheibengewebe ausgewertet wurde; **(B)** Alter der untersuchten humanen Patienten am OP-Tag in Form eines Boxplots; **(C)** Das Histogramm zeigt die Verteilung der Diagnosen wegen derer die in die Untersuchung eingeschlossenen Patienten operiert wurden; der Schwerpunkt liegt hierbei bei degenerativen Veränderungen; **(D)** Das Histogramm veranschaulicht die Beschwerdedauer der untersuchten humanen Patienten; **(E)** Das Kreisdiagramm zeigt die bei den untersuchten humanen Patienten angewendeten OP-Verfahren mit Schwerpunkt auf Instrumentationsspondylodesen; **(F)** Das Histogramm zeigt die Höhe des Bandscheibenfaches der untersuchten humanen Bandscheiben an, hierbei steht vor allem die untere Lendenwirbelsäule im Fokus. BWK = Brustwirbelkörper, LKW = Lendenwirbelkörper, SWK = Sakralwirbelkörper, OP = Operation.

Acht der untersuchten Patienten waren männlich (53 %), sieben der untersuchten Patienten waren weiblich (47 %).

Der Median des Patientenalters betrug 58 (29 - 74).

Die am häufigsten gestellte Diagnose und somit OP-Grund war bei acht der untersuchten Patienten eine Osteochondrose. Vier der untersuchten Patienten wurden aufgrund eines Bandscheibenvorfalles operiert. Zwei Patienten der untersuchten Stichprobe mussten aufgrund mechanischer Bandscheibenschädigung nach Wirbelkörperfraktur operiert werden und ein Patient wies eine Spondylolisthese (Wirbelgleiten) auf.

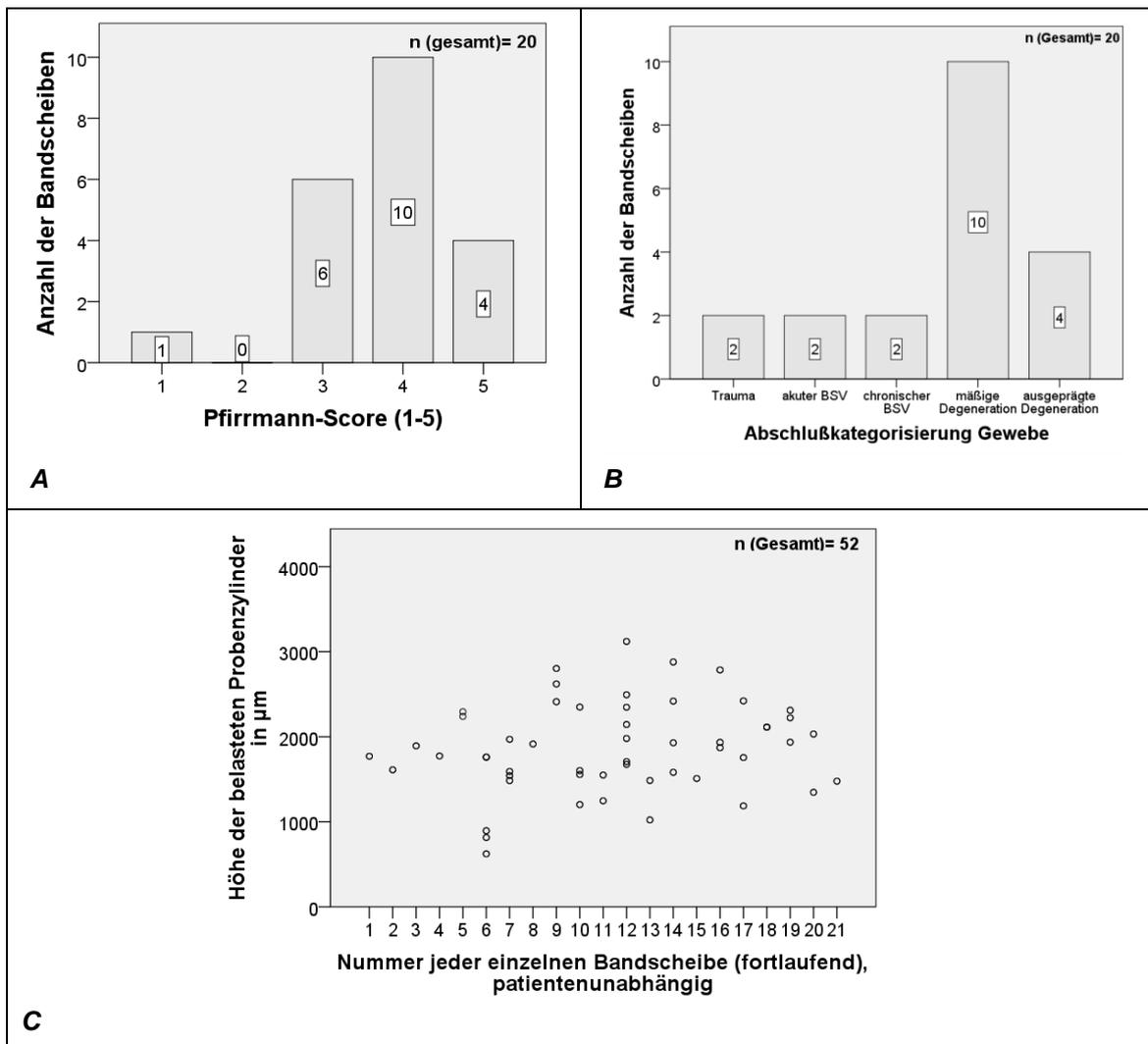
Die Beschwerdedauer wurde in drei Kategorien unterteilt: in akute Beschwerden unter vier Wochen, Beschwerden, die länger als vier Wochen vorhanden waren, allerdings kürzer als ein Jahr bestanden und Beschwerden, die bereits über ein Jahr persistierten.

Acht Patienten (53 %) hatten bereits seit über vier Wochen, allerdings weniger als einem Jahr die Beschwerden, die zur Operation führten. Die Beschwerden der restlichen Patienten verteilten sich in etwa gleichmäßig auf die anderen beiden Kategorien.

Abhängig von der Diagnose und dem Gewebezustand wurden zwei verschiedene OP-Verfahren zur Entnahme von Bandscheibenmaterial angewandt. Zum einen erfolgte eine sogenannte Instrumentationsspondylodese von dorsal mit lumbaler interkorporeller Fusion (12 Patienten, 80%) und zum

anderen eine Nukleotomie (3 Patienten, 20%).

Das am meisten operierte Bandscheibenfach bei den untersuchten Patientenproben war das Bandscheibenfach zwischen LWK 4/5 (8 Bandscheiben, 40 %). Jeweils 25 % der untersuchten Gewebeproben stammten mit jeweils fünf Bandscheiben aus den Bandscheibenfächern zwischen LWK 3/4 bzw. zwischen LWK 5/ SWK 1. Die restlichen Bandscheiben entstammen den Bandscheibenfächern zwischen BWK 10/11, sowie LWK 1/2. Dieses Ergebnis der Bandscheibenhöhen ist repräsentativ für die Häufigkeit der betroffenen Höhen in weiteren Studien. Miller et al. führten 1988 beispielsweise eine Studie mit 600 Bandscheibenproben obduzierter Patienten durch, hierbei zeigten sich gehäuft degenerative Veränderungen in den Bandscheibenfächern LWK 4/5 und LWK 3/4 im Vergleich mit den anderen Bandscheibenfächern⁴⁵.



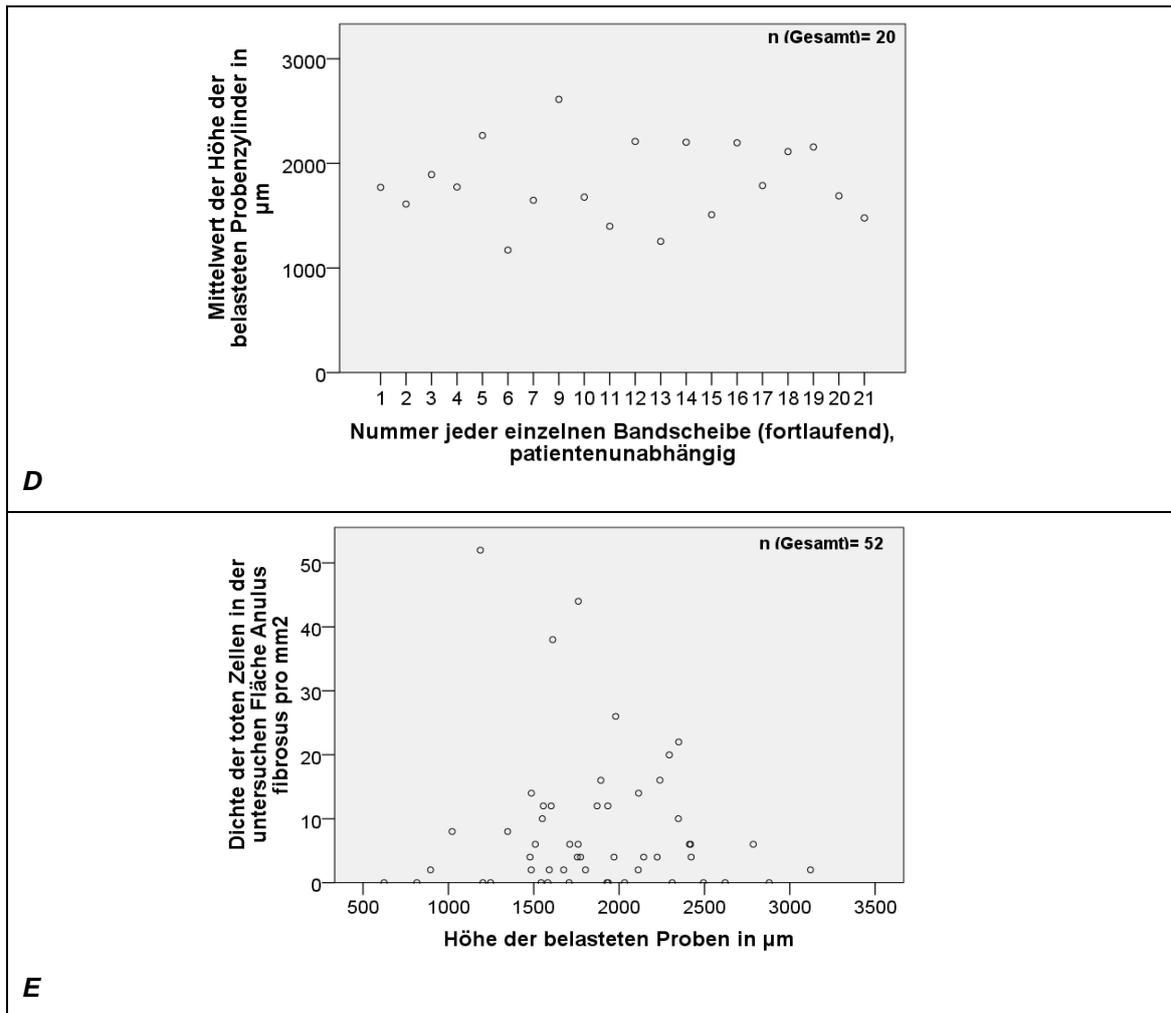


Abb. 24: Untersuchte Bandscheibenzylinder und Gewebekategorisierung. **(A)** Das Histogramm zeigt die Einteilung des untersuchten humanen Bandscheibengewebes nach dem Pfirrmann-Score, wobei Grad 5 eine endgradig destruierte Bandscheibe bedeutet, dem Wert 2 des Scores wurde kein Gewebe zugeordnet, die meisten Bandscheibenproben lagen um den Wert 4 herum; **(B)** Das Histogramm veranschaulicht die Verteilung der untersuchten humanen Bandscheiben in Kategorien nach Gewebetyp, der Fokus der untersuchten Gewebeproben liegt auf degeneriertem Bandscheibengewebe; **(C)** In diesem Punktdiagramm steht jeder einzelne Punkt für einen belasteten humanen Probenzylinder, diese sind nach Bandscheibennummer angeordnet; **(D)** Das Punktdiagramm zeigt die gemittelten Höhen der belasteten Probenzylinder in μm für jede untersuchte Bandscheibe; **(E)** Das Streudiagramm zeigt die Dichte toter Zellen pro mm^2 in Abhängigkeit von der Probenhöhe in μm , es besteht nach Spearman keine Korrelation zwischen den beiden Variablen ($\rho = 0,039$, $p = 0,781$). BSV = Bandscheibenvorfall.

Die Qualität der Bandscheiben wurde, wie bereits beschrieben, anhand des MRT-Bildes bestimmt und in die verschiedenen Grade des Pfirrmann-Scores eingeteilt. Zehn der untersuchten Bandscheiben (50 %) wurden dem Grad 4 zugeordnet, fünf Bandscheiben (25 %) der untersuchten Bandscheiben dem Grad 3. Dem Grad 5 wurden vier (20 %) der untersuchten Bandscheiben zugeordnet, eine Bandscheibe (5 %) entspricht dem Grad 1. Dem Grad 2 wurde keine der untersuchten Bandscheiben zugeordnet.

Anhand des Pfirrmann-Scores, der Anamnese und des konventionellen Röntgenbildes wurde auch die Abschlusskategorisierung des Gewebes vorgenommen. Die Grenze zwischen akutem und chronischem Bandscheibenvorfall wurde nicht anhand der allgemeingültigen Definition der Chronizität gezogen, sondern aufgrund der zu erwartenden zellulären Veränderung bei Entzündung. Hierfür wurde eine Beschwerdedauer von vier Wochen festgelegt. Maßgeblich entscheidend bei der Trennung in mäßige und fortgeschrittene Degeneration war vor allem der Pfirrmann-Score. Als fortgeschrittene Degeneration wurde hier das Pfirrmann-Stadium 5 bezeichnet. Zehn Bandscheiben (50 % des untersuchten Gewebes) wiesen bereits eine mäßige Degeneration auf, vier Bandscheiben (20 %) eine ausgeprägte Degeneration. Die restlichen Bandscheiben verteilten sich gleichmäßig auf Traumagewebe, Gewebe eines akuten bzw. chronischen Bandscheibenvorfalles. Untersucht wurden letztendlich gestanzte Zylinder von 6 mm im Durchmesser. Da das vorliegende Gewebe von unterschiedlicher Qualität war, unterschied sich die Anzahl der Zylinder sowie auch die Höhe der gestanzten Zylinder. Erfasst wurden nur die Probenhöhen der belasteten Zylinder.

Bei Normalverteilung lag der Mittelwert der Probenhöhe aller belasteten Zylinder bei 1862 μm ($\pm 532 \mu\text{m}$). Die Extrema lagen bei 623 μm und 3121 μm . Bei der letztendlichen Auswertung wurde für jede untersuchte Bandscheibe der Mittelwert aus den jeweils untersuchten Zylindern für die weiteren Analysen verwendet.

Der Mittelwert der Probenhöhenmittelwerte lag bei 1821 μm mit einer Standardabweichung von $\pm 378 \mu\text{m}$. Die geringste gemittelte Höhe der Probenzylinder lag bei 1171 μm , die größte gemittelte Höhe bei 2612 μm .

Bei der Untersuchung einer möglichen Korrelation zwischen Zylinderhöhe und der Dichte toter Zellen pro mm² lag der Pearson Korrelationskoeffizient bei $r = -0,068$ ($p = 0,631$), was auf keinen positiven Zusammenhang der beiden Merkmale hindeutet.

3.2 Analyse der Zelldichte

Die Zellzahl wurde für belastete und unbelastete Proben jeweils in einem Quadrat der Größe 500 µm x 500 µm bestimmt. Anschließend wurde die Zelldichte berechnet.

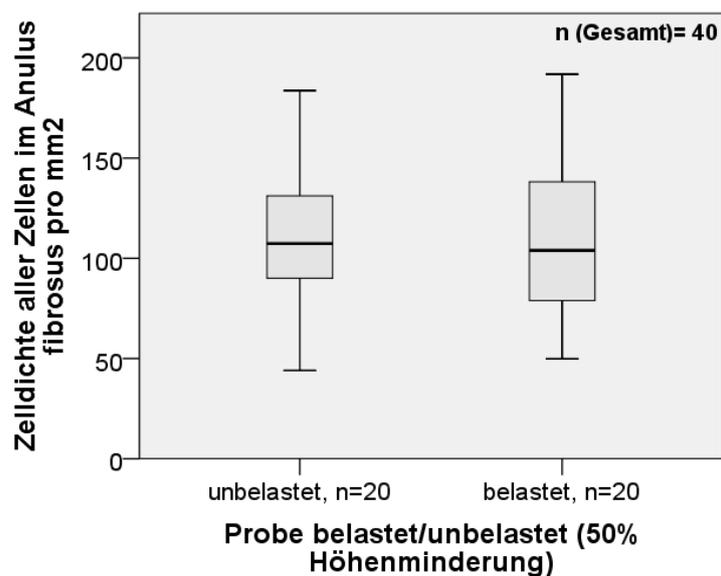


Abb. 25: Die Boxplots stellen die Zelldichte der Zellen im humanen Annulus fibrosus pro mm² in unbelasteten und belasteten Proben dar. Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Zelldichte unbelasteter und belasteter Gewebeproben im Wilcoxon-Test ($p = 0,391$).

Bei nicht normalverteilter Zelldichte der unbelasteten und belasteten Proben, konnte für die unbelasteten Gewebeproben ein Median von 107 (44 - 184) Zellen/mm² ermittelt werden. Bei den belasteten Gewebeproben lagen die Werte der Zelldichte bei 104 (50 - 192) Zellen/mm².

Die Zelldichte in den unbelasteten und belasteten Proben zeigte im Wilcoxon-Test keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,391$).

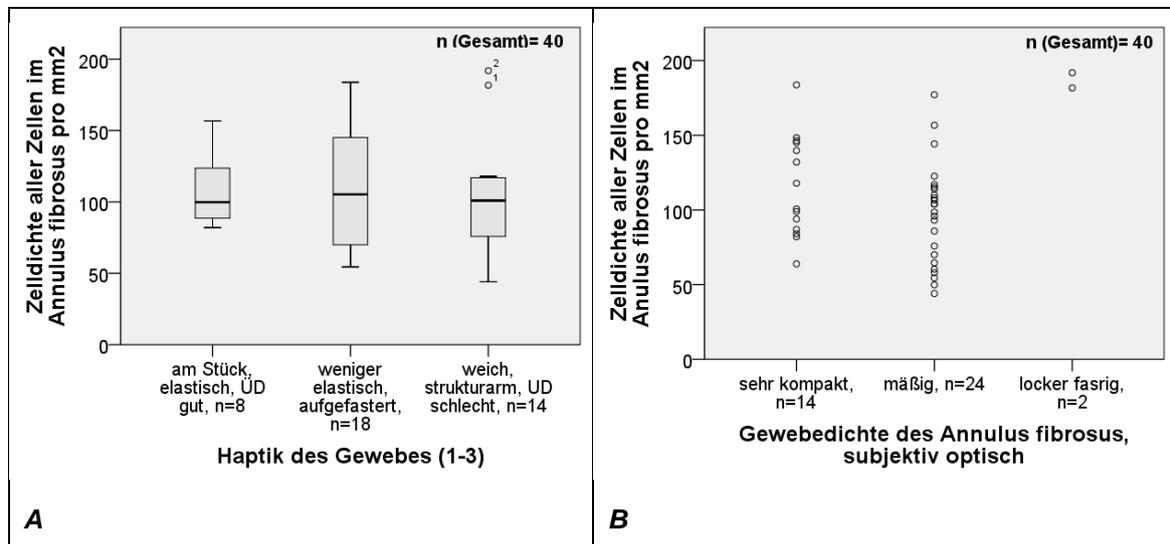


Abb. 26: Zelldichte im Annulus fibrosus nach Haptik und Gewebedichte. **(A)** Die Boxplots zeigen die Zelldichte im humanen Annulus fibrosus pro mm^2 unterteilt nach makroskopisch beurteilter Haptik des Gewebes, der Median der verschiedenen kategorisierten Gewebe lag jeweils um den Wert 100 Zellen/ mm^2 ; **(B)** Das Punktdiagramm zeigt die Zelldichte im humanen Annulus fibrosus pro mm^2 unterteilt nach mikroskopisch beurteilter Gewebedichte des Gewebes, jeder Punkt steht für einen der Gewebedichte zugeordneten Zylinder, der Median lag wiederum jeweils um den Wert 100 Zellen/ mm^2 . ÜD = überdurchschnittlich, UD = unterdurchschnittlich

Die Datensätze der Zelldichte in den Geweben unterschiedlicher Haptik und Gewebedichte zeigten keine Normalverteilung. Bandscheibengewebe, welches makroskopisch am Stück, elastisch und überdurchschnittlich gut war, wies im Median eine Zelldichte von 100 (82 - 157) Zellen/ mm^2 auf. Dieser Wert lag bei dem makroskopisch weniger elastischen und aufgefasterten Bandscheibengewebe bei 105 (54 - 184) Zellen/ mm^2 . Makroskopisch weiches, strukturarmes, unterdurchschnittlich schlechtes Gewebe besaß im Median eine Zelldichte von 101 (44 - 192) Zellen/ mm^2 .

Der Kendall-Tau-b zeigte mit einem Korrelationskoeffizienten von $\tau = -0,057$ ($p = 0,649$) kaum einen Zusammenhang der beiden Merkmale.

Mikroskopisch sehr kompaktes Bandscheibengewebe besaß im Median eine Zelldichte von 109 (64 - 184) Zellen/mm². Bei eher mäßig kompaktem mikroskopisch beurteiltem Bandscheibengewebe lag dieser Wert bei 101 (44 - 177) Zellen/mm². Mikroskopisch locker fasriges Gewebe wies eine Zelldichte von 187 (182 - 192) Zellen/mm² auf.

Auch hier konnte keine Korrelation mittels des Kendall-Tau-b mit einem Korrelationskoeffizienten von $\tau = -0,039$ ($p = 0,765$) beobachtet werden.

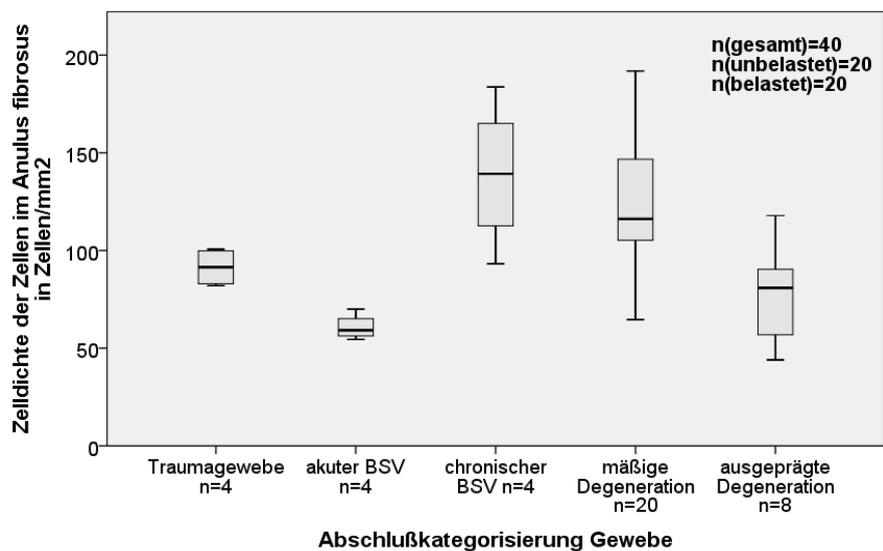


Abb. 27: Dargestellt ist die Zelldichte pro mm² der unterschiedlich degenerierten Gewebe in Boxplots. Die höchste Zelldichte befand sich im Gewebe des chronischen Bandscheibenvorfall (BSV) mit im Median 139 (93 - 184) Zellen/mm². Die geringste Zelldichte befand sich im akuten BSV mit im Median 59 (54 - 70) Zellen/mm². BSV=Bandscheibenvorfall.

Tabelle 11: ANOVA und Tukey-Testung der Zelldichte in unterschiedlich degeneriertem Gewebe

unbelastete Gewebeproben	Traumagewebe	akuter BSV	chron. BSV	mäßige Degeneration	ausgepr. Degeneration
Traumagewebe		p = 0,561**	p = 0,157**	p = 0,175**	p = 0,927**
akuter BSV	p = 0,561**		p = 0,004**	p = 0,001**	p = 0,878**
chronischer BSV	p = 0,157**	p = 0,004**		p = 0,946**	p = 0,010**
mäßige Degeneration	p = 0,175**	p = 0,001**	p = 0,946**		p = 0,002**
ausgeprägte Degeneration	p = 0,927**	p = 0,878**	p = 0,010**	p = 0,002**	
ANOVA	p < 0,001*				

Tabelle 11 zeigt die Zelldichte in den unterschiedlich degenerierten Geweben mit signifikantem Wert der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA)* mit $p < 0,001$ und den Werten der post-hoc-Analyse mittels Tukey-Test**. In der post-hoc-Analyse mittels Tukey ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen akutem und chronischen BSV ($p = 0,004$), akutem BSV und mäßiger Degeneration ($p = 0,001$), chronischem BSV und ausgeprägter Degeneration ($p = 0,010$) und mäßiger und ausgeprägter Degeneration ($p = 0,002$). Ansonsten ergaben sich keine signifikanten Werte. BSV=Bandscheibenvorfall.

3.3 Analyse der im Bandscheibengewebe vorkommenden Zellmuster

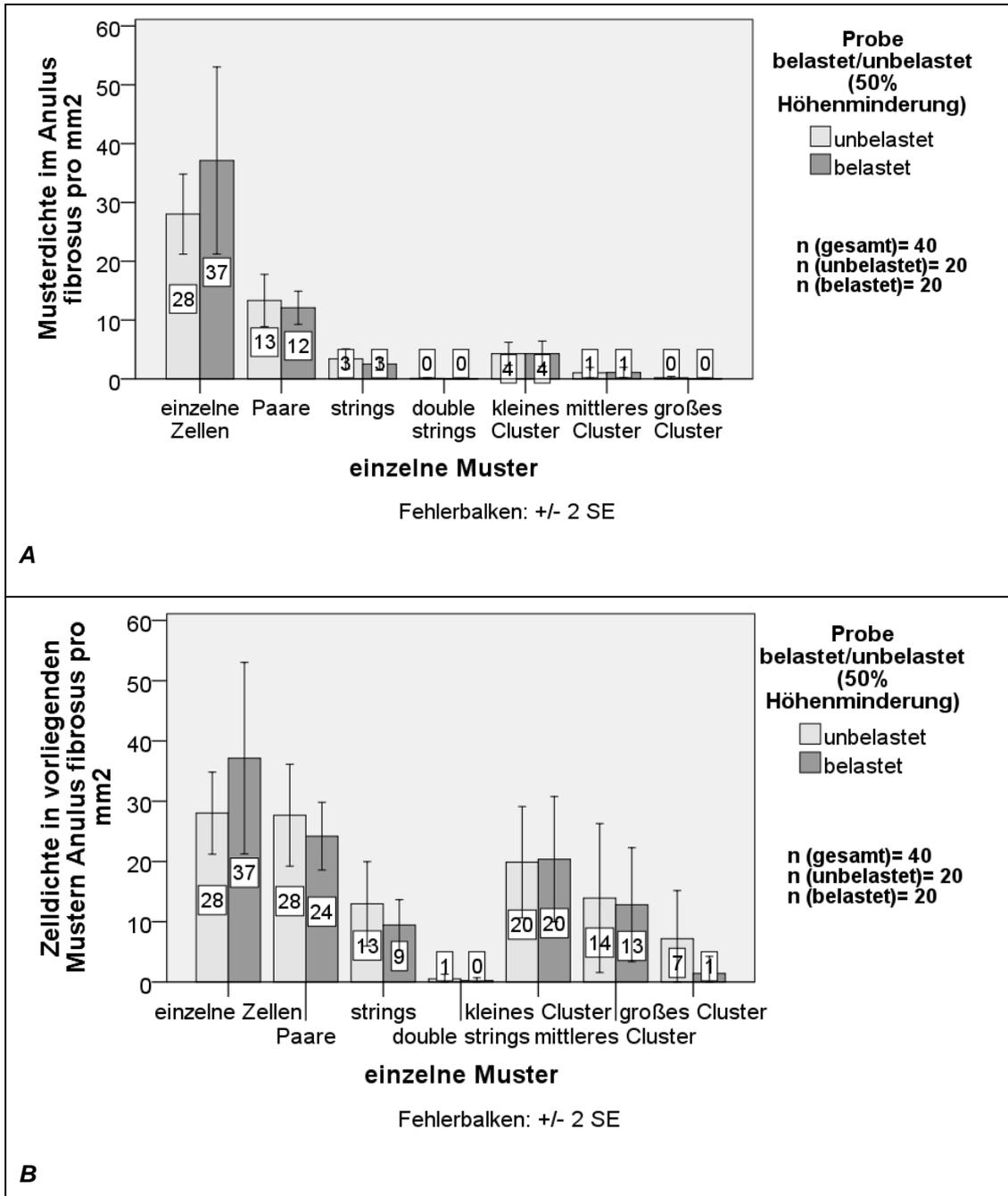


Abb. 28: Muster- und musterbezogene Zelldichte in den Mustern im humanen Bandscheibengewebe. **(A)** Dichteverteilung definierter Zellmuster und **(B)** Zelldichte in den definierten Mustern im humanen Anulus fibrosus pro mm² aufgeteilt nach unbelasteten und belasteten Proben mit dem Standardfehler (SE).

Tabelle 12: Muster in unbelasteten und belasteten Proben

Muster	Musteranzahl in % in unbelasteten Proben	Musteranzahl in % in belasteten Proben	Wilcoxon-Test
einzelne Zellen	57	65	p = 0,301
Paare	27	21	
strings	6	5	
double strings	0	0	
kleine Cluster	8	7	
mittlere Cluster	2	2	
große Cluster	0	0	

Tabelle 12 zeigt die Anzahl der vorhandenen Zellmuster in % in unbelastetem und belastetem Gewebe. In unbelastetem und belastetem Gewebe war mit 57 % bzw. 65 % einzelne Zellen das am meisten vorkommende Zellmuster, etwa ein Viertel der vorliegenden Muster waren Paare. Im Wilcoxon-Test zeigte sich mit einem $p = 0,301$ kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Zellmuster zwischen unbelastetem und belastetem Gewebe.

Zwischen unbelastetem und belastetem Gewebe stellte sich im Wilcoxon-Test kein signifikanter Unterschied zwischen der Verteilung der vorkommenden Zellmuster mit einem $p = 0,301$ dar.

Tabelle 13: Zelldichte in den Mustern unbelasteter und belasteter Proben

Muster	Zelldichte der Muster in % in unbelasteten Proben	Zelldichte der Muster in % in belasteten Proben	Wilcoxon-Test
einzelne Zellen	25	36	p = 0,794
Paare	25	23	
strings	12	9	
double strings	1	0	
kleine Cluster	18	19	
mittlere Cluster	13	12	
große Cluster	6	1	

Tabelle 13 zeigt die Zelldichte in den einzelnen Mustern bei unbelasteten und belasteten Gewebeproben. Die Zellen, die einzeln vorliegen nehmen hier nur noch 25 % bzw. 36 % ein, die Zelldichte der Paare 25 % bzw. 23 %. Prozentual gewinnen bei Betrachtung der Zelldichte in den Mustern vor allem die strings, die kleinen und mittleren Cluster. Die Zelldichte in den Mustern war im Wilcoxon-Test mit einem $p = 0,794$ in unbelastetem und belastetem Gewebe nicht signifikant unterschiedlich.

Beachtet man die Zelldichte in den Mustern bei unbelasteten und belasteten Gewebeproben zeigt sich wiederum kein signifikanter Unterschied im Wilcoxon-

Test mit einem $p = 0,794$.

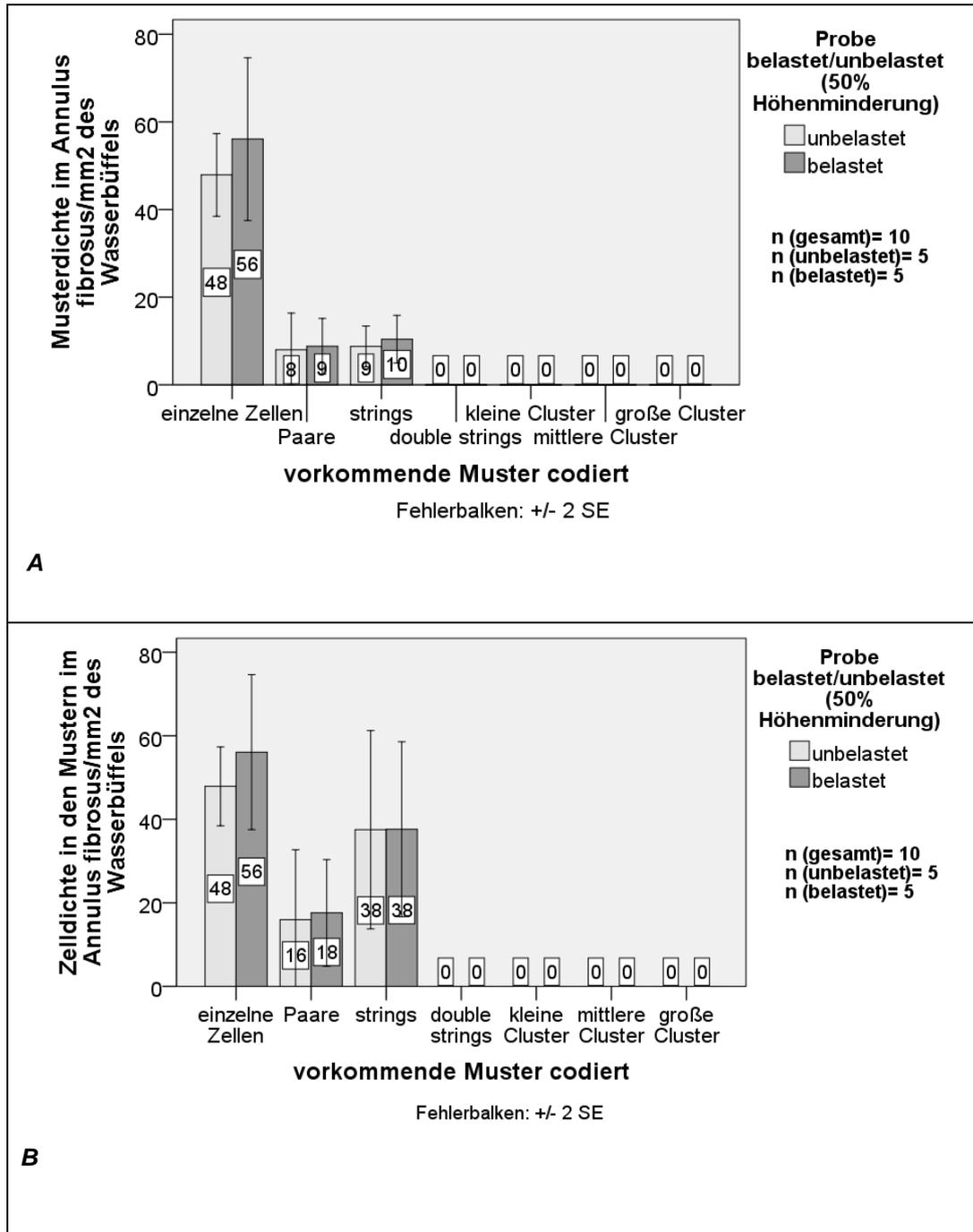


Abb. 29: Muster- und musterbezogene Zelldichte in den Mustern im Bandscheibengewebe des Wasserbüffels. **(A)** Dichteverteilung definierter Zellmuster und **(B)** Zelldichte in den definierten Mustern im Annulus fibrosus pro mm² des Wasserbüffels aufgeteilt nach unbelasteten und belasteten Proben mit dem Standardfehler (SE).

Tabelle 14: Muster in unbelastetem und belastetem Gewebe des Wasserbüffels

Muster	Musteranzahl in % in unbelasteten Proben	Musteranzahl in % in belasteten Proben	Wilcoxon-Test
einzelne Zellen	74	75	p = 0,650
Paare	12	12	
strings	14	13	

Tabelle 14 zeigt die Anzahl der vorhandenen Zellmuster in % in unbelastetem und belastetem Gewebe des ausgewachsenen Wasserbüffels. In unbelastetem und belastetem Gewebe war mit 74 % bzw. 75 % einzelne Zellen das am meisten vorkommende Zellmuster. Der Wilcoxon-Test der Verteilung der unterschiedlichen Muster in unbelastetem und belastetem Gewebe war mit $p = 0,650$ nicht signifikant.

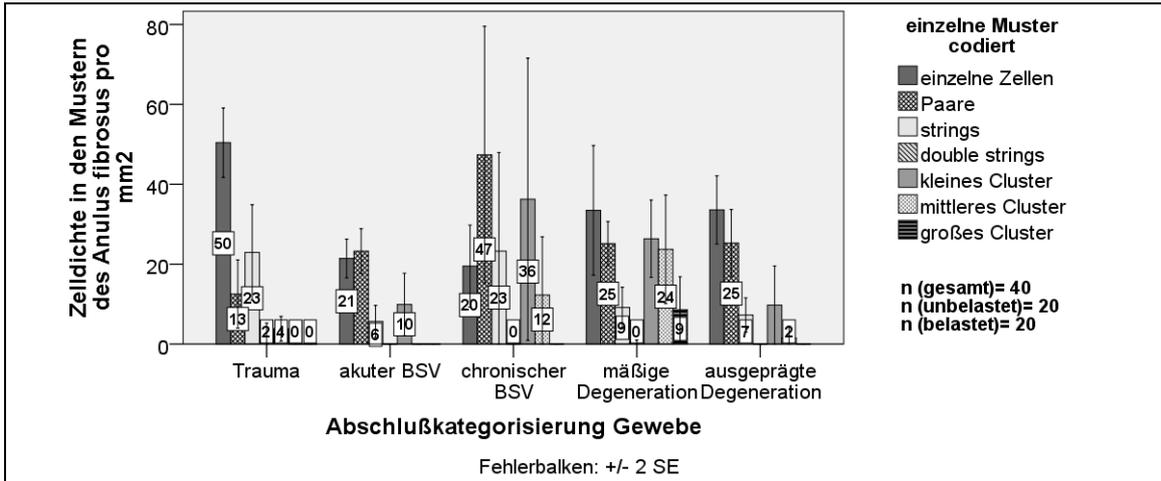
Im Vergleich zu den bereits degenerierten humanen Gewebeproben sieht man im gesunden Gewebe des Wasserbüffels vor allem einzelne Zellen, gefolgt von strings und Paaren. Die Zellmuster kommen in unbelasteten und belasteten Proben in etwa derselben Anzahl vor. Double strings und Cluster konnten nicht beobachtet werden. Im Wilcoxon-Test zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Musteranzahl zwischen unbelasteten und belasteten Proben.

Tabelle 15: Zelldichte in den Mustern in unbelastetem und belastetem Gewebe des Wasserbüffels

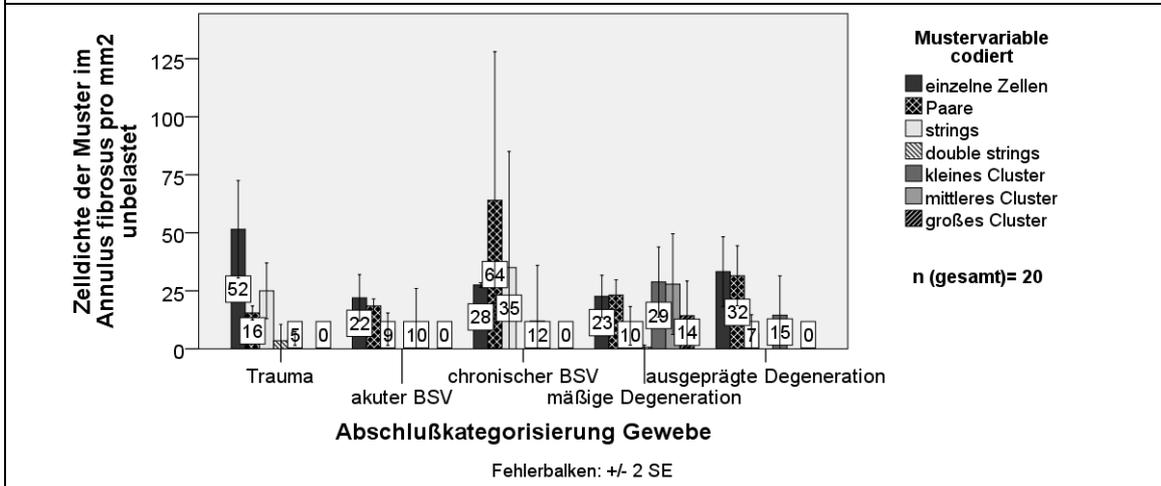
Muster	Zelldichte der Muster in % in unbelasteten Proben	Zelldichte der Muster in % in belasteten Proben	Wilcoxon-Test
einzelne Zellen	47	50	p = 0,865
Paare	16	16	
strings	37	34	

Tabelle 15 zeigt die Anzahl der vorhandenen Zellmuster in % in unbelastetem und belastetem Gewebe des ausgewachsenen Wasserbüffels. In unbelastetem und belastetem Gewebe war mit 47 % bzw. 50 % einzelne Zellen das am meisten vorkommende Zellmuster. Der Wilcoxon-Test der Ausprägung der unterschiedlichen Muster war mit $p = 0,650$ nicht signifikant.

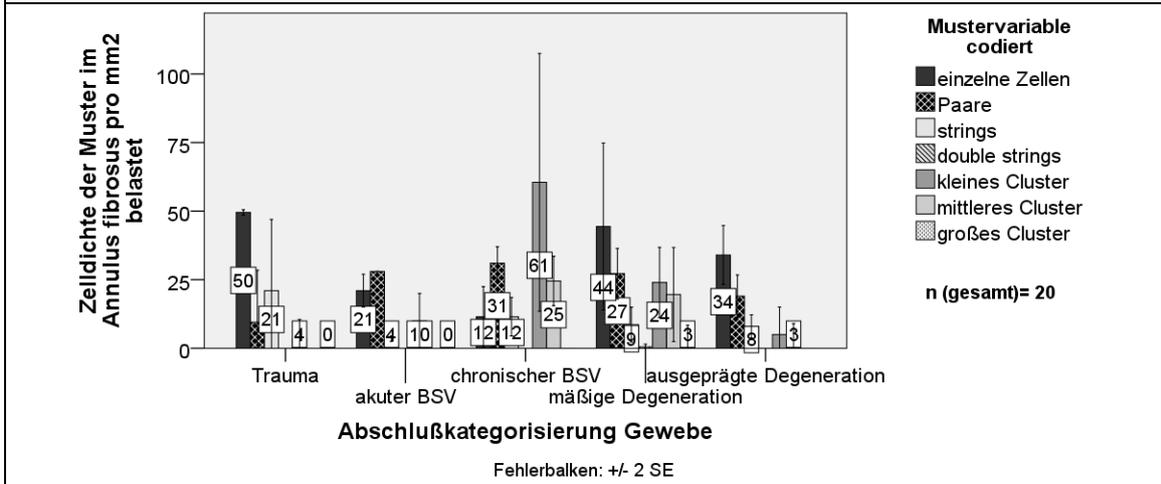
Betrachtet man die Zelldichte in den einzelnen Mustern, befinden sich mehr als doppelt so viele Zellen in strings im Vergleich zu den Paaren. Die meisten Zellen liegen jedoch einzeln im Gewebe. Hier zeigte sich im durchgeführten Wilcoxon-Test ebenfalls kein signifikanter Unterschied bei der Zelldichte der Muster in unbelasteten und belasteten Proben



A



B



C

Abb. 30: Die Histogramme zeigen die Zelldichte im humanen Annulus fibrosus in Zellen/mm² in den einzelnen Mustern abhängig vom Gewebezustand mit dem Standardfehler (SE) **(A)** im gesamten Gewebe, **(B)** im unbelasteten Gewebe und **(C)** im belasteten Gewebe. BSV=Bandscheibenvorfall.

Tabelle 16: Zellverteilung in den Mustern verschiedener Gewebetypen

Muster	einzelne Zellen	Paare	strings	double strings	kleine Cluster	mittlere Cluster	große Cluster
Zelldichte der Muster in % im ges. Traumagewebe	54,5	14	25	2	4,5	0	0
Zelldichte der Muster in % in Traumagewebe UB	51	16	24	4	5	0	0
Zelldichte der Muster in % in Traumagewebe B	59	12	24,5	0	4,5	0	0
Zelldichte der Muster in % im ges. Gewebe des akuten BSV	35	38	10	0	17	0	0
Zelldichte der Muster in % im akuten BSV UB	36,5	31,5	15	0	17	0	0
Zelldichte der Muster in % im akuten BSV B	33	44,5	6,5	0	16	0	0
Zelldichte der Muster in % im ges. Gewebe des chronischen BSV	14,5	34	16,5	0	26	9	0
Zelldichte der Muster in % im chronischen BSV UB	20	46	25	0	9	0	0
Zelldichte der Muster in % im chronischen BSV B	8,5	22	8,5	0	43	18	0
Zelldichte der Muster in % im ges. Gewebe mäßiger Degeneration	26	20	7	0	21	19	7
Zelldichte der Muster in % im Gewebe mäßiger Degeneration UB	18	18	8	0,5	22,5	22	11
Zelldichte der Muster in % im Gewebe mäßiger Degeneration B	34,5	21	7	1	19	15,5	2
Zelldichte der Muster in % im ges. Gewebe ausgepr. Degeneration	43,5	32	9	0	13	2,5	0
Zelldichte der Muster in % im Gewebe ausgepr. Degeneration UB	38	37	8	0	17	0	0
Zelldichte der Muster in % im Gewebe ausgepr. Degeneration B	49,5	27,5	11,5	0	7	4,5	0

Tabelle 16: zeigt die prozentuale Verteilung der Zellen in den vorkommenden Zellmustern der verschiedenen Gewebetypen im gesamten untersuchten Gewebe und aufgeteilt nach unbelastetem und belastetem Gewebe. ges. = gesamt; UB = unbelastet; B = belastet; BSV = Bandscheibenvorfall.

Musterverteilung in den untersuchten Gewebeproben

Es fällt auf, dass zunächst mit stärkerer Degeneration des Gewebes die Verteilung der Zellen in Cluster ansteigt, bei ausgeprägter Degeneration finden sich allerdings wieder weniger Zellen in Clustern (siehe Tabelle 16).

Im Kruskal-Wallis-Test ergab sich ein signifikanter Unterschied mit $p < 0,001$ in der Verteilung der verschiedenen Zellmuster in den unterschiedlich degenerierten Gewebetypen was bedeutet, dass sich die Zellen abhängig vom Gewebetyp und somit auch degenerationsabhängig vermehrt in bestimmte Zellmuster organisieren (siehe Tabelle A1 im Anhang).

In der Korrelationsanalyse nach Kendall-Tau-b besteht mit einem Korrelationskoeffizienten von $\tau = 0,112$ und einem $p = 0,002$ eine schwache, aber signifikante Korrelation im gesamten Gewebe zwischen den vorkommenden Zellmustern und den verschiedenen Gewebekategorien. Abhängig vom Degenerationsstadium liegt also eine bestimmte Musterverteilung vor. Dieses Ergebnis bestätigte sich im unbelasteten Gewebe ($\tau = 0,155$; $p = 0,002$), sowie auch im belasteten Gewebe ($\tau = 0,155$; $p < 0,001$).

Zelldichte in den einzelnen Mustern

Mittels des Kruskal-Wallis-Tests wurde die Zelldichte in den einzelnen Mustern in den unterschiedlich degenerierten Geweben überprüft. Hier zeigte sich im gesamten Gewebe ein signifikanter Unterschied in der Zelldichte einzelner Zellen ($p = 0,043$; siehe Tabelle A 2 im Anhang) und in der Zelldichte der Paare ($p = 0,031$; siehe Tabelle A 3 im Anhang) zwischen den Gewebetypen im gesamten getesteten Gewebe.

In der Zelldichte der strings ($p = 0,084$), der double strings ($p = 0,490$) und der kleinen Cluster ($p = 0,106$) zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Kruskal-Wallis-Test zwischen den Gewebetypen im gesamten Gewebe (siehe Tabelle A 4 im Anhang).

Signifikant unterschied sich wiederum die Zelldichte der mittleren Cluster im Kruskal-Wallis-Test im gesamten ($p = 0,014$), sowie im unbelasteten ($p = 0,047$)

untersuchten Gewebe (siehe Tabelle A 5 im Anhang).

Bei den großen Clustern ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Zelldichte im Kruskal-Wallis-Test ($p = 0,365$) im gesamten untersuchten Gewebe (siehe Tabelle A 6 im Anhang).

3.4 Analyse lebender und toter Zellen in den einzelnen Mustern

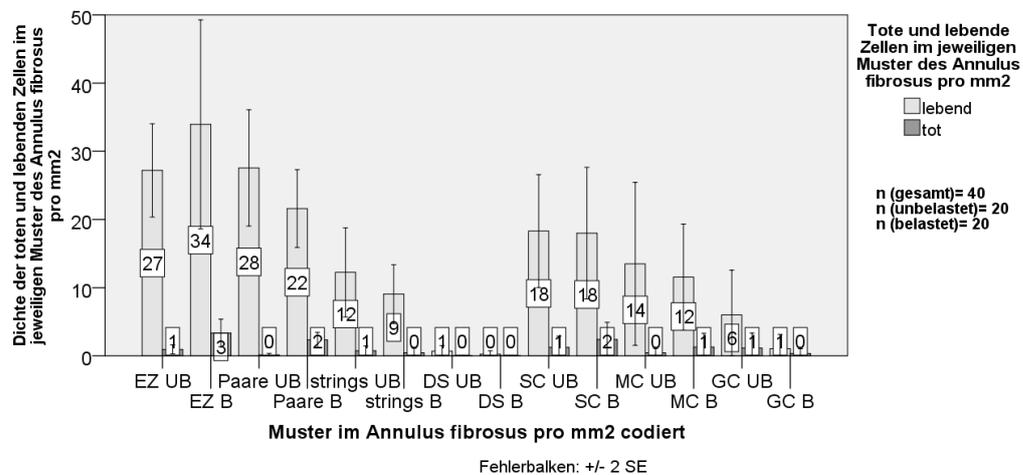


Abb. 31: Das Balkendiagramm zeigt die Dichte der lebenden und toten Zellen im humanen Annulus fibrosus in Zellen/mm² in den einzelnen Zellmustern aufgeteilt nach unbelastetem und belastetem Gewebe mit dem Standardfehler (SE); EZ = einzelne Zellen; DS = double strings; SC = kleine Cluster; MC = mittlere Cluster; GC = große Cluster; UB = unbelastet, B = belastet. In belastetem Gewebe sind doppelt bis acht Mal so viele Zellen tot, wie in unbelastetem Gewebe.

Tabelle 17: Lebende und tote Zellen in den Gewebeproben belastungsabhängig

Zellmuster	Gewebe unbelastet		Gewebe belastet	
	lebende Zellen in %	tote Zellen in %	lebende Zellen in %	tote Zellen in %
einzelne Zellen	96	4	92	8
Paare	100	0	92	8
strings	92	8	100	0
double strings	100	0	100	0
kleines Cluster	95	5	90	10
mittleres Cluster	100	0	92	8
großes Cluster	86	14	100	0

Tabelle 17 zeigt die prozentuale Anzahl lebender und toter Zellen in unbelastetem und belastetem Gewebe.

Betrachtet man das Schaubild 31 fällt auf, dass die toten Zellen in den einzelnen Zellmustern jeweils nur einen geringen Prozentsatz einnehmen, unabhängig von der Belastung des Gewebes.

Im Wilcoxon-Test zeigt sich, dass sich in den Zellmustern einzelne Zellen ($p = 0,024$) und Paare ($p = 0,002$) signifikant mehr tote Zellen im belasteten Gewebe im Vergleich zum unbelasteten Gewebe befinden.

In den anderen Zellmustern unterschied sich die Anzahl toter Zellen nicht signifikant zwischen unbelastetem und belastetem Gewebe (siehe Tabelle 18).

Tabelle 18: Tote Zellen in den unbelasteten bzw. belasteten Zellmustern

	einzelne Zellen		Paare		strings		double strings		kleine Cluster		mittlere Cluster		große Cluster	
	UB	B	UB	B	UB	B	UB	B	UB	B	UB	B	UB	B
Wilcoxon-Test	p = 0,024		p = 0,002		p = 0,438		p = 1,000		p = 0,121		p = 0,279		p = 0,593	

Tabelle 18 zeigt die Ergebnisse der Wilcoxon-Testung bezüglich toter Zellen in den unbelasteten und belasteten Zellmustern. Nur in den Mustern einzelne Zellen ($p = 0,024$) und Paare ($p = 0,002$) finden sich signifikant mehr tote Zellen in den belasteten Gewebeproben. UB = unbelastet, B = belastet.

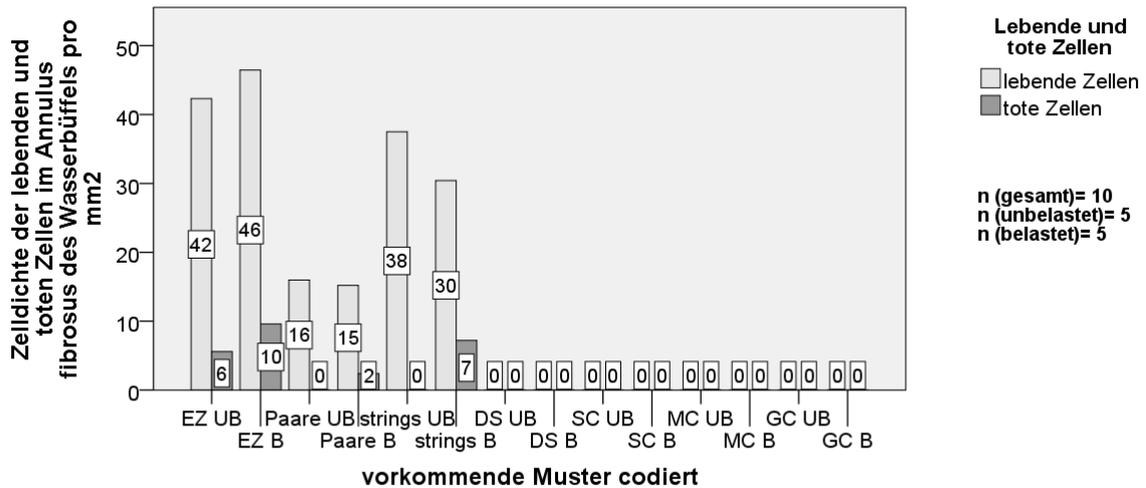


Abb. 32: Zelldichte toter und lebender Zellen pro mm² in den einzelnen Zellmustern belastungsabhängig in der Bandscheibe des Wasserbüffels; EZ = einzelne Zellen; DS = double strings; SC = kleine Cluster; MC = mittlere Cluster; GC = große Cluster; UB = unbelastet, B = belastet.

Tabelle 19: Lebende und tote Zellen in Gewebeproben belastungsabhängig beim Wasserbüffel

Zellmuster	Unbelastetes Gewebe		Belastetes Gewebe	
	lebende Zellen in %	tote Zellen in %	lebende Zellen in %	tote Zellen in %
einzelne Zellen	87,5	12,5	82	18
Paare	100	0	88	12
strings	100	0	81	19

Tabelle 19: Prozentualer Anteil lebender und toter Zellen belastungsabhängig im Bandscheibengewebe des Wasserbüffels: belastetes Bandscheibengewebe weist, wie auch schon das belastete humane Gewebe mehr tote Zellen auf. Aufgrund der kleinen Fallzahl wurde keine Signifikanztestung durchgeführt.

3.5 Analyse toter und lebender Zellen

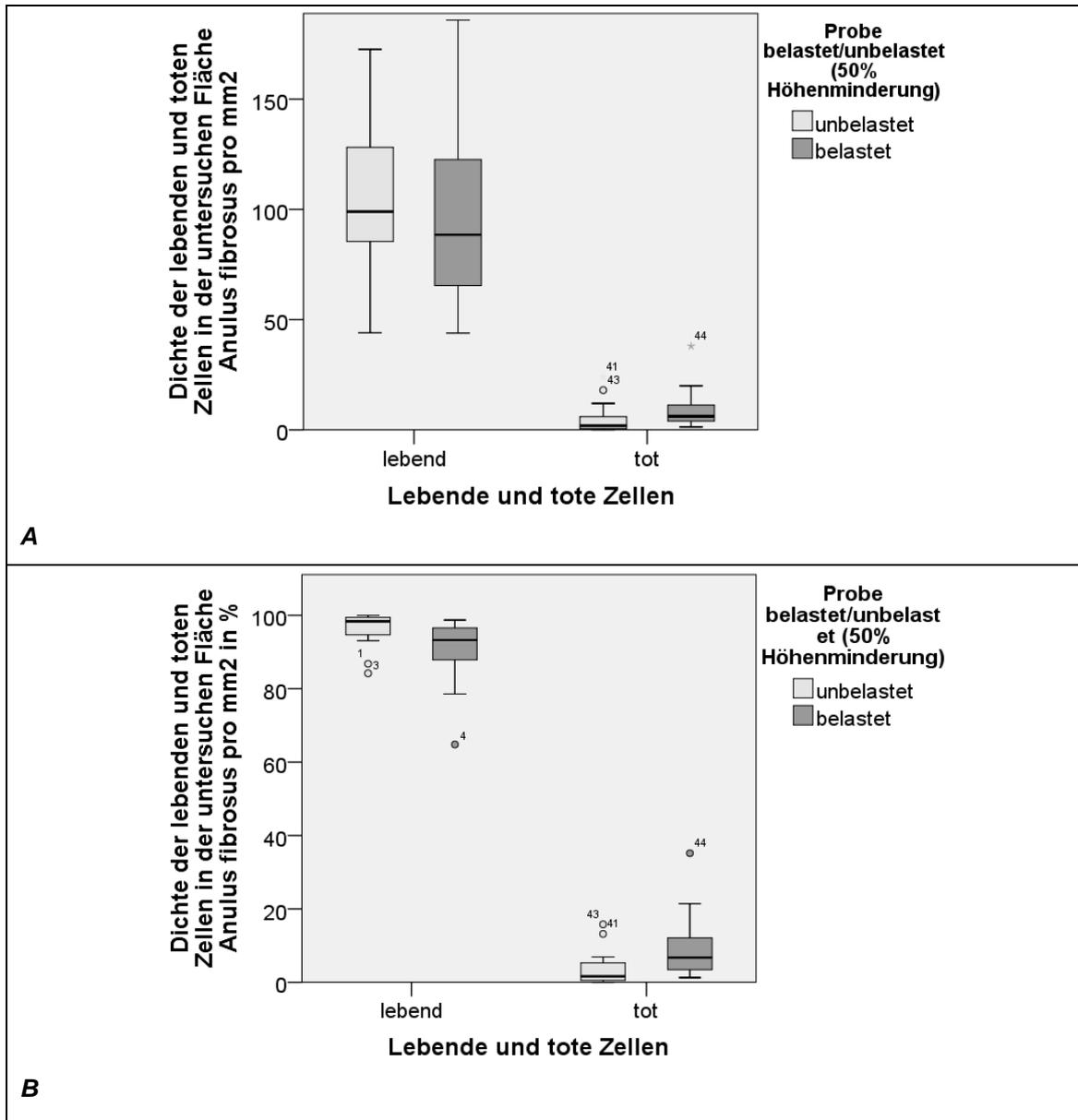


Abb. 33: Die Boxplots zeigen **(A)** die absolute Zelldichte bzw. **(B)** die prozentuale Zelldichte lebender und toter Zellen im humanen Annulus fibrosus in Abhängigkeit von Belastung; belastetes Gewebe weist mehr tote Zellen auf als die unbelasteten Gewebeproben.

Table 20: lebende und tote Zellen in unbelastetem und belastetem Gewebe

	lebende Zellen unbelastet	tote Zellen unbelastet	lebende Zellen belastet	tote Zellen belastet
Zelldichte Median (Minimum - Maximum)	99 (44 - 173)	2 (0 - 24)	89 (44 - 186)	6 (1 - 38)
Zelldichte in %	98,5 (84 - 100)	1,5 (0 - 16)	93,5 (65 - 99)	6,5 (1 - 35)
Standardabweichung	4,430		8,375	
p-Wert (Wilcoxon) = 0,004				

Table 20 zeigt den Median der absoluten Anzahl sowie den prozentualen Anteil lebender und toter Zellen in unbelastetem und belastetem Gewebe. Zudem ist jeweils die Standardabweichung angegeben und das Ergebnis des signifikanten Wilcoxon-Tests mit $p = 0,004$, welches zeigt, dass in den belasteten Gewebeproben deutlich mehr tote Zellen zu finden waren, als in den unbelasteten Gewebeproben.

Im Annulus fibrosus der unbelasteten Bandscheibe findet sich eine Zelldichte von im Median 99 lebenden Zellen pro mm^2 (99 %). Die mediane Zelldichte von 2 toten Zellen pro mm^2 , entspricht 1,5 % aller Zellen. Die lebenden Zellen in belasteten Bandscheiben weisen eine Zelldichte von im Median 89 Zellen/ mm^2 auf (94 %), die toten Zellen eine Zelldichte von 6 Zellen/ mm^2 (6,5 %).

Im Wilcoxon-Test ist dieser Unterschied mit $p = 0,004$ mit einer höheren Zelldichte an toten Zellen in belasteten Gewebeproben signifikant.

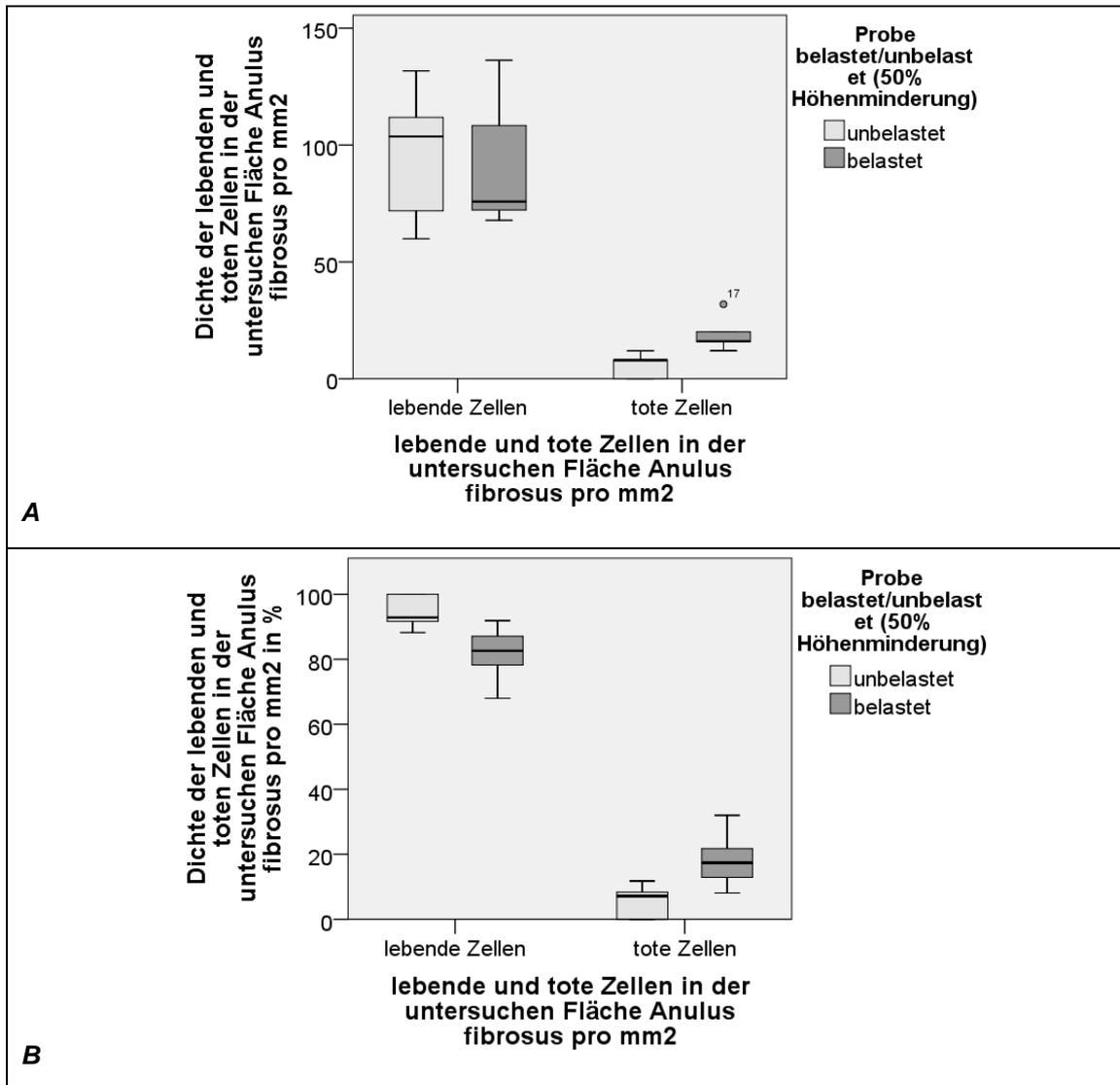


Abb. 34: Die Boxplots zeigen **(A)** die absolute Zelldichte bzw. **(B)** die prozentuale Zelldichte lebender und toter Zellen belastungsabhängig in der Bandscheibe des Wasserbüffels; belastetes Gewebe weist deutlich mehr tote Zellen im Vergleich zu unbelastetem Gewebe auf.

Tabelle 21: Lebende und tote Zellen in unbelastetem und belastetem Gewebe des Wasserbüffels

	lebende Zellen unbelastet	tote Zellen unbelastet	lebende Zellen belastet	tote Zellen belastet
Zelldichte Median (Minimum - Maximum)	104 (60 - 132)	8 (0 - 12)	76 (68 - 136)	16 (12 - 32)
Zelldichte in %	93 (88 - 100)	7 (0 - 12)	83 (68 - 92)	17 (8 - 32)
p-Wert (Wilcoxon) = 0,005				

Tabelle 21 zeigt den Mittelwert der absoluten Anzahl sowie den prozentualen Anteil lebender und toter Zellen in unbelastetem und belastetem bovinen Gewebe. Zudem ist das Ergebnis des signifikanten Wilcoxon-Tests mit $p = 0,005$ angegeben, welches zeigt, dass in den belasteten Gewebeproben deutlich mehr tote Zellen zu finden waren, als in den unbelasteten Gewebeproben.

Auch im nicht degenerierten Gewebe des Wasserbüffels zeigt sich im Wilcoxon-Test ein signifikanter Unterschied in der Zelldichte der lebenden und toten Zellen abhängig von der Belastung mit einem $p = 0,005$.

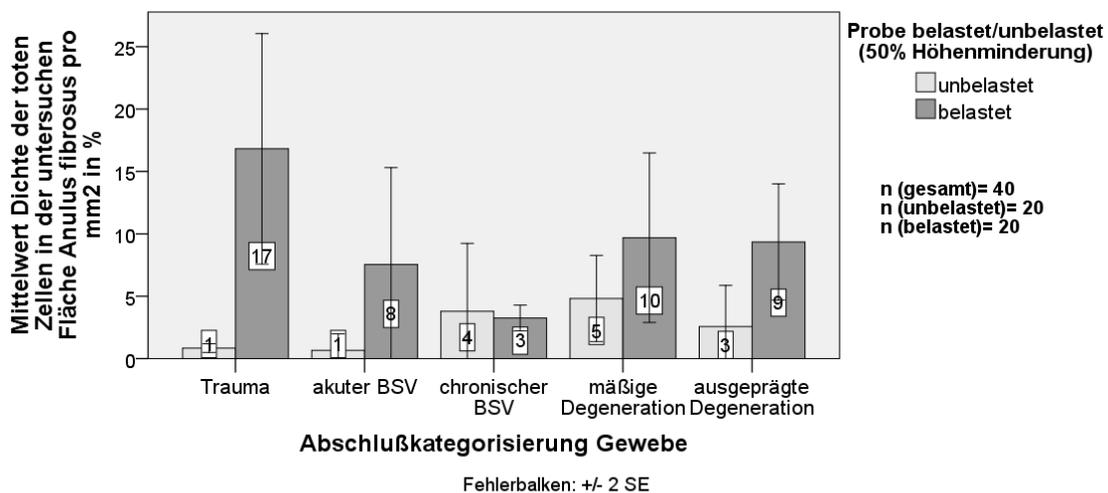


Abb. 35: Das Balkendiagramm zeigt die Zelldichte der toten Zellen im humanen Annulus fibrosus in Zellen/mm² in % mit dem Standardfehler (SE) abhängig vom Gewebetyp und der Belastung. BSV=Bandscheibenvorfall.

Vor allem in belasteten Traumabandscheiben findet sich im Annulus fibrosus mit einer durchschnittlichen Zelldichte von 17 % toten Zellen/mm² die höchste

Zelldichte an toten Zellen. Die zweitgrößte Zelldichte an toten Zellen weisen wiederum mäßig und ausgeprägt degeneriertes belastetes Gewebe auf mit durchschnittlich 10 % und 9 % toter Zellen/mm², gefolgt von belastetem Gewebe eines akuten und chronischen Bandscheibenvorfalls mit 8 % und 3 % toten Zellen/mm². Anhand der Grafik 35 erkennt man in den untersuchten Proben vermeintlich bei den fortgeschritteneren Verschleißprozessen bereits bei den unbelasteten Proben eine höhere Basisrate an untergehenden Zellen. Vor allem der chronische Bandscheibenvorfall, mäßig und ausgeprägt degeneriertes Gewebe weisen bereits unbelastet bis zu 5 % tote Zellen/mm² im Annulus fibrosus auf.

Allerdings ist im Kendall-Tau-b-Test ($\tau = 0,093$, $p = 0,617$) hier keine starke oder signifikante Korrelation der toten Zellen und der Gewebedegeneration auf der Basis der vorliegenden Daten bei den unbelasteten Gewebeproben zu erheben. Bei den belasteten Proben findet sich ein ähnlicher Befund ($\tau = - 0,026$, $p = 0,888$).

Eine einfaktorielle Varianzanalyse wurde durchgeführt, es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im prozentualen Anteil toter Zellen zwischen den unterschiedlich degenerierten Gewebetypen unbelasteten Gewebes ($p = 0,665$) sowie belasteter Gewebeproben ($p = 0,683$).

3.6 Auswertung der perizellulären Matrix

Ein zentraler Punkt dieser Arbeit ist die Untersuchung der Ausprägung der perizellulären Matrix in belasteten und unbelasteten Gewebeproben. Bei der verblindeten Auswertung wurde nach drei Kategorien die Ausprägung der PZM ausgewertet: < 25 % PZM, 25 – 75 % PZM und > 75 % PZM um die Zelle herum. Für die statistische Auswertung wurde wie bereits beschrieben ein gewichteter Mittelwert zur besseren Darstellbarkeit der Ausprägung der PZM genutzt (siehe Teil: Statistische Auswertung).

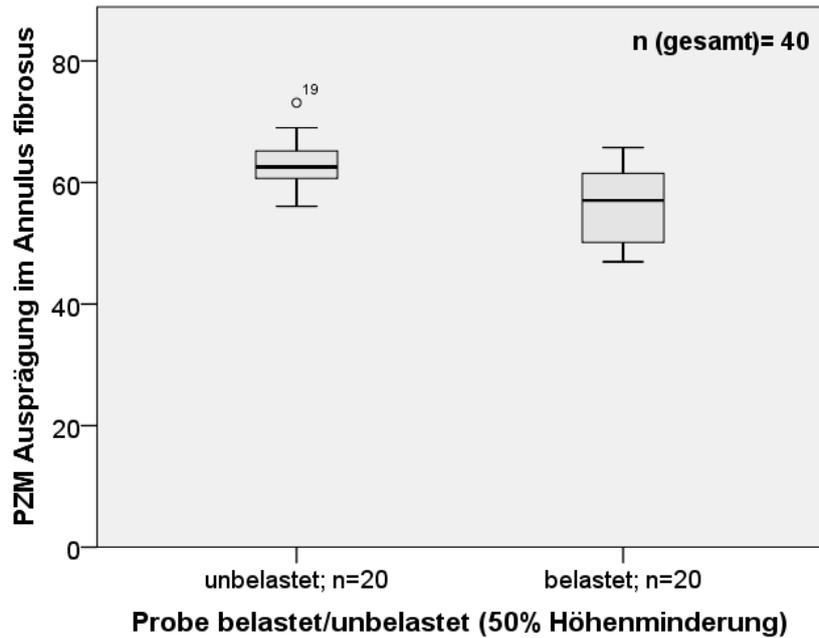


Abb. 36: Der Boxplot zeigt die Ausprägung der humanen perizellulären Matrix in unbelasteten und belasteten Proben, es besteht ein signifikanter Unterschied $p < 0,001$ (Wilcoxon-Test) in der PZM-Ausprägung mit weniger PZM der belasteten Proben. PZM = perizelluläre Matrix.

Die nicht normalverteilte PZM-Ausprägung in unbelasteten Gewebeproben weist einen Median von 62,5 % (56 % - 73 %) auf. Dieser Wert liegt in belasteten Gewebeproben bei 57 % (47 % - 66 %).

Im Wilcoxon-Test ergibt sich ein signifikanter Unterschied mit einem $p < 0,001$ in der PZM-Ausprägung zwischen unbelasteten und belasteten Gewebeproben.

Tabelle 22: PZM-Ausprägung in unbelasteten und belasteten Gewebeproben

	unbelastete Gewebeprobe	belastete Gewebeprobe
PZM-Ausprägung	62,5 % (56 – 63 %)	57 % (47 - 66%)
p-Wert (Wilcoxon-Test)	$p < 0,001$	

Tabelle 22 stellt die Ausprägung der PZM im Median (Minimum - Maximum) dar, zudem zeigt sie das Ergebnis des durchgeführten Wilcoxon-Tests, welches einen signifikanten Unterschied in der PZM-Ausprägung zwischen belastetem und unbelastetem Gewebe mit $p < 0,001$ ergab. PZM = perizelluläre Matrix.

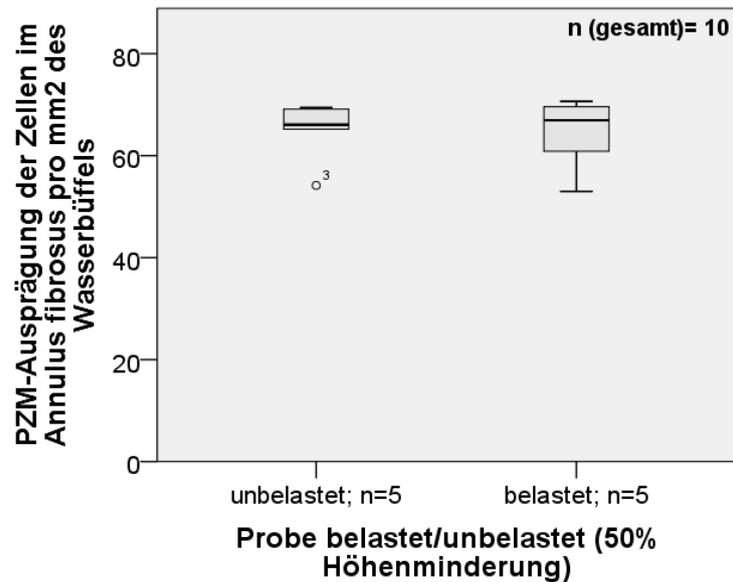


Abb. 37: PZM-Ausprägung belastungsabhängig in der Bandscheibe des Wasserbüffels ohne signifikanten Unterschied in unbelasteten und belasteten Gewebeproben. PZM = perizelluläre Matrix.

Die PZM-Ausprägung in unbelasteten Gewebeproben beim Wasserbüffel zeigt einen Median von 66 % (54 % - 69 %). In belasteten Gewebeproben liegt der Median für die PZM-Ausprägung beim Wasserbüffel bei 67 % (53 % - 71 %). Im Wilcoxon-Test ergibt sich im Gegensatz zu den humanen Proben mit einem $p = 0,893$ kein signifikanter Unterschied in der PZM-Ausprägung zwischen unbelasteten und belasteten Gewebeproben.

Tabelle 23: PZM-Ausprägung in unbelasteten und belasteten Gewebeproben des Wasserbüffels

	unbelastete Gewebeprobe	belastete Gewebeprobe
PZM-Ausprägung	66 % (54 – 69 %)	67 % (53 – 71 %)
p-Wert (Wilcoxon-Test)	$p = 0,893$	

Tabelle 23 stellt die Ausprägung der PZM des ausgewachsenen Wasserbüffels im Median (Minimum - Maximum) dar, zudem zeigt sie das Ergebnis des durchgeführten Wilcoxon-Tests, welches keinen signifikanten Unterschied in der PZM-Ausprägung zwischen belastetem und unbelastetem Gewebe mit $p = 0,893$ ergab. PZM=perizelluläre Matrix.

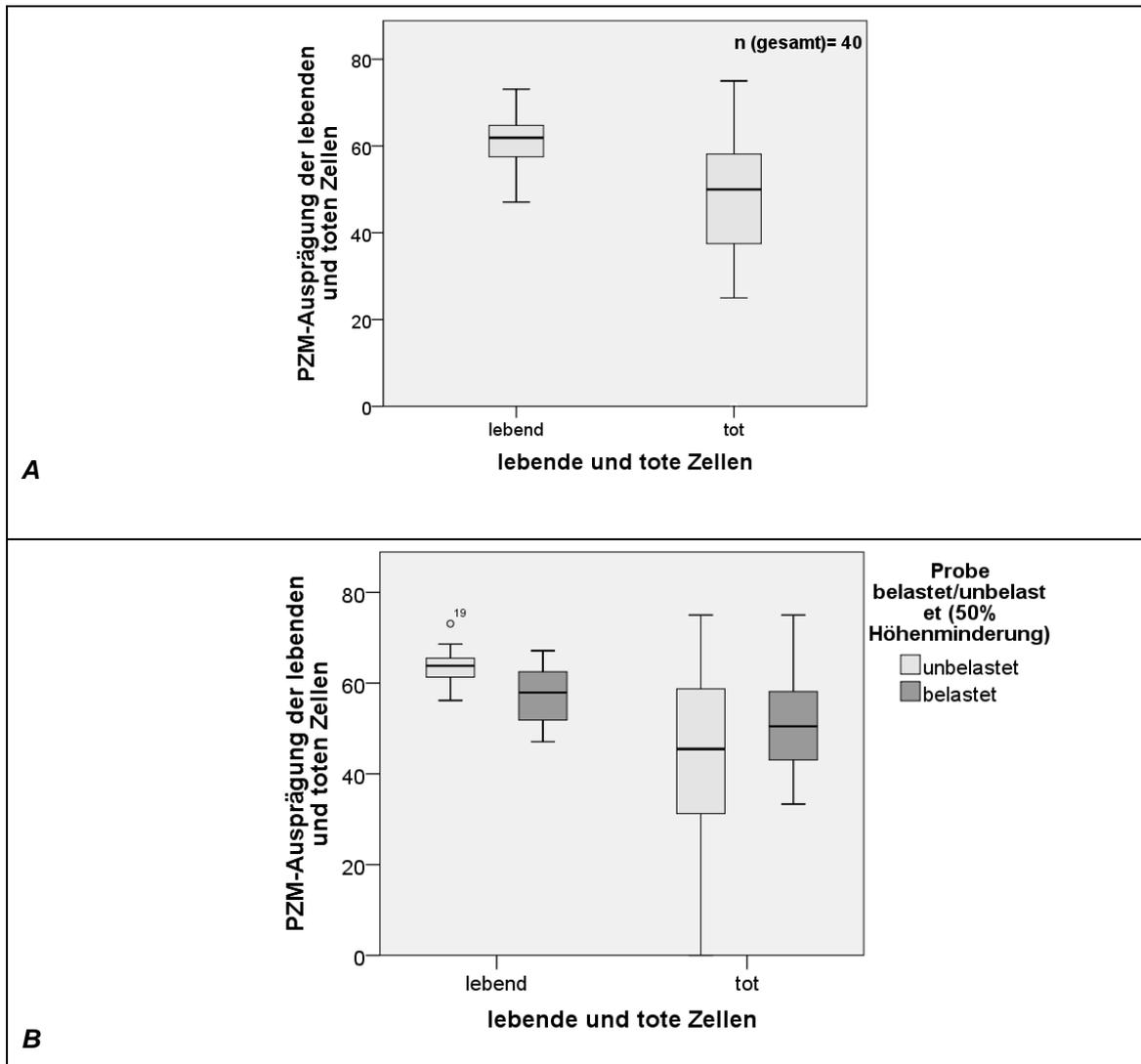


Abb. 38: PZM-Ausprägung der lebenden und toten Zellen (**A**) aller humanen Gewebeproben bzw. (**B**) getrennt nach unbelasteten und belasteten Gewebeproben. Lebende Zellen besitzen signifikant mehr perizelluläre Matrix als tote Zellen, in belasteten Bandscheiben sterben Zellen mit noch mehr vorhandener PZM im Vergleich zu unbelastetem Bandscheibengewebe. PZM = perizelluläre Matrix.

Tabelle 24 zeigt einen signifikanten Unterschied im Wilcoxon-Test zwischen der PZM-Ausprägung der toten und der lebenden Zellen aller Gewebeproben, sowie einen signifikanten Unterschied der PZM-Ausprägung der lebenden Zellen in unbelastetem und belastetem Gewebe mit geringerer PZM-Ausprägung in belasteten Gewebeproben.

Tabelle 24: PZM-Ausprägung lebender und toter Zellen im gesamten, unbelasteten und belasteten Gewebe

	PZM-Ausprägung lebender Zellen	PZM-Ausprägung toter Zellen	p-Wert (Wilcoxon-Test)
alle Gewebeproben	62 % (47 – 73 %)	50 % (0 – 75 %)	p < 0,001
unbelastete Gewebeprobe	64 % (56 – 73 %)	46 % (0 – 75 %)	
belastete Gewebeprobe	58 % (47 – 67 %)	51 % (33 – 75 %)	
p-Wert (Wilcoxon-Test)	p_{lebende Zellen} < 0,001	p _{tote Zellen} = 0,147	

Tabelle 24 stellt die Ausprägung der PZM aller Gewebeproben bzw. unbelasteten und belasteten Gewebes im Median (Minimum - Maximum) dar. Zudem zeigt sie das Ergebnis der durchgeführten Wilcoxon-Tests. Es ergibt sich ein signifikanter Unterschied mit $p < 0,001$ in der PZM-Ausprägung lebender und toter Zellen in allen Gewebeproben mit stärker ausgeprägter PZM der lebenden Zellen. Zudem zeigt sich ein signifikanter Unterschied mit $p < 0,001$ in der PZM-Ausprägung lebender Zellen in unbelasteten und belasteten Gewebeproben mit geringerer PZM-Ausprägung lebender Zellen in belasteten Gewebeproben. Die toten Zellen zeigen mit $p = 0,147$ keinen signifikanten Unterschied in der PZM-Ausprägung zwischen unbelasteten und belasteten Gewebeproben. *PZM = perizelluläre Matrix.*

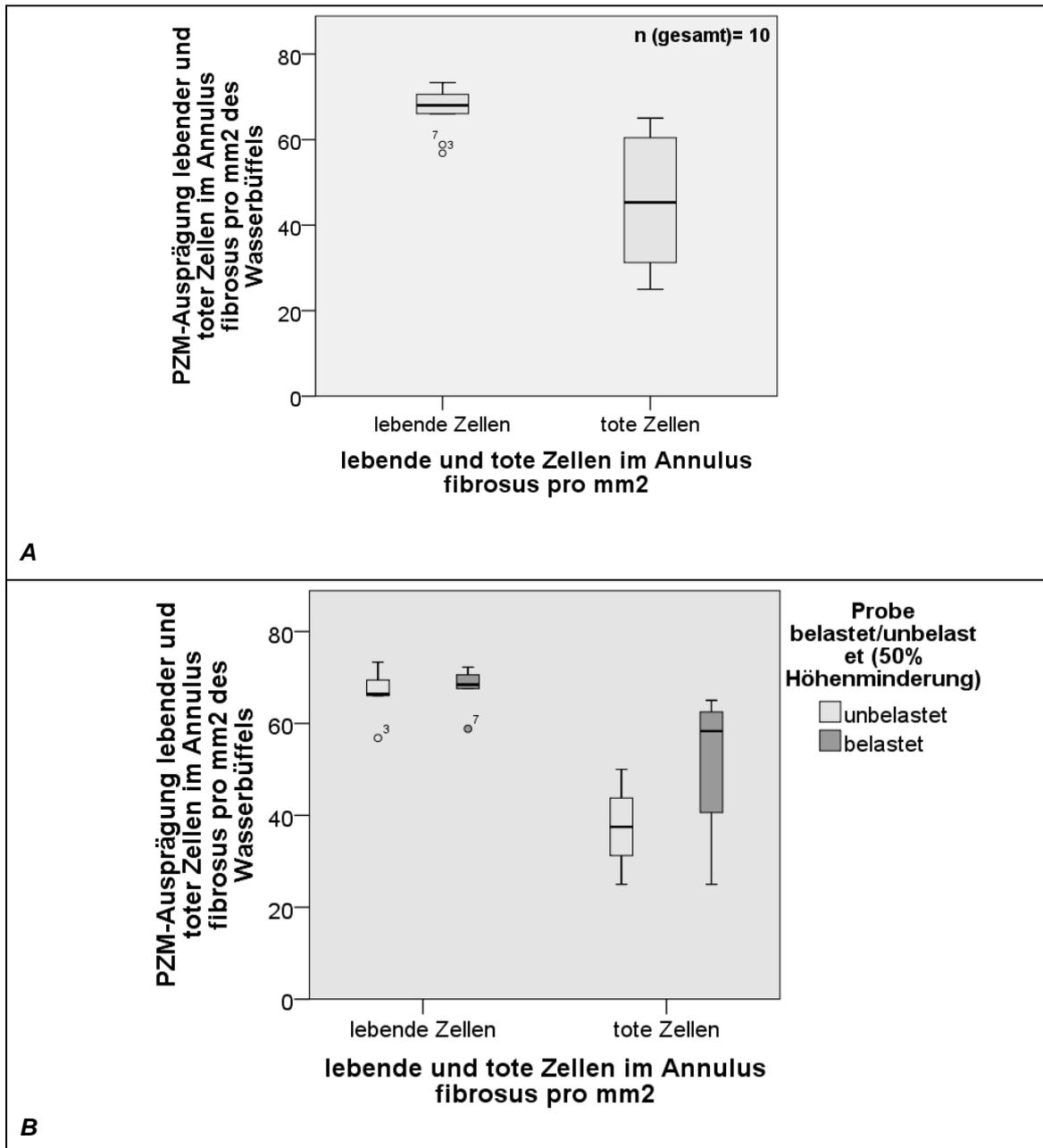


Abb. 39: PZM-Ausprägung lebender und toter Zellen in der Bandscheibe des Wasserbüffels (**A**) aller Gewebeproben bzw. (**B**) belastungsabhängig. Tote Zellen besitzen signifikant weniger PZM, im nicht degenerierten Gewebe sterben in den belasteten Gewebeproben ebenfalls mehr Zellen mit noch mehr vorhandener PZM wie in unbelasteten Gewebeproben. PZM = perizelluläre Matrix.

Tabelle 25: PZM-Ausprägung lebender und toter Zellen im gesamten, unbelasteten und belasteten Gewebe des Wasserbüffels

	PZM-Ausprägung lebender Zellen	PZM-Ausprägung toter Zellen	p-Wert (Wilcoxon-Test)
alle Gewebeproben	68 % (57 – 73 %)	45 % (25 – 65 %)	p = 0,005
unbelastete Gewebeprobe	66 % (38 – 69 %)	38 % (25 – 50 %)	
belastete Gewebeprobe	68 % (59 – 72 %)	58 % (25 – 65 %)	
p-Wert (Wilcoxon-Test)	p _{lebende Zellen} = 0,225	p _{tote Zellen} = 0,144	

Tabelle 25 stellt die Ausprägung der PZM aller Gewebeproben bzw. unbelasteten und belasteten Gewebes des ausgewachsenen Wasserbüffels im Median (Minimum - Maximum) dar, zudem zeigt sie die Ergebnisse der durchgeführten Wilcoxon-Tests. Es ergibt sich ein signifikanter Unterschied mit $p = 0,005$ in der PZM-Ausprägung lebender und toter Zellen in allen Gewebeproben mit stärker ausgeprägter PZM lebender Zellen. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied mit $p = 0,225$ in der PZM-Ausprägung lebender Zellen bzw. mit $p = 0,144$ in der PZM-Ausprägung toter Zellen in unbelasteten und belasteten Gewebeproben. PZM = perizelluläre Matrix.

Tabelle 25 zeigt einen signifikanten Unterschied im Wilcoxon-Test zwischen der PZM-Ausprägung der toten und der lebenden Zellen im gesamten Bandscheibengewebe des Wasserbüffels.

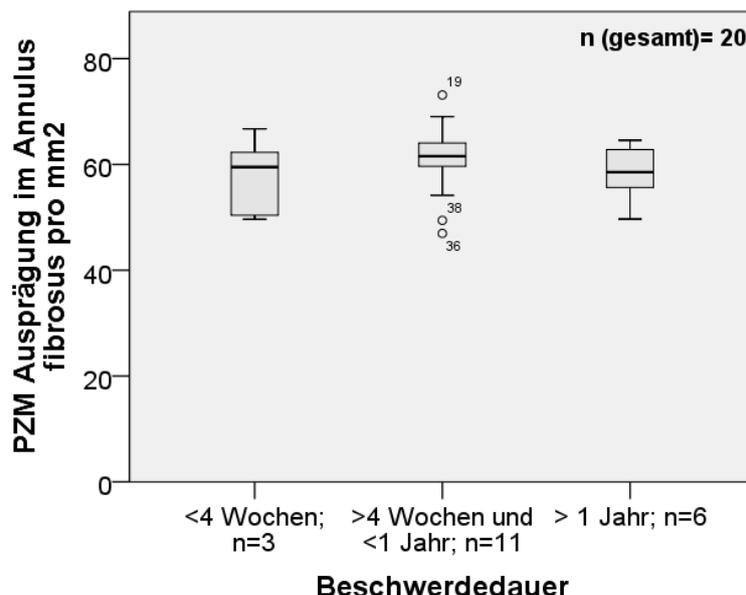


Abb. 40: Die Boxplots zeigen die PZM-Ausprägung, anhand der PZM-Formel berechnet, der unterschiedlichen Beschwerdezeiträume, der Median liegt jeweils um die 60 %. PZM=perizelluläre Matrix.

Die nicht normalverteilte Ausprägung der PZM bei einer Beschwerdedauer von < 4 Wochen weist einen Median von 59 % (50 % - 67 %) auf. Dieser Wert liegt bei einer Beschwerdedauer von > 4 Wochen und < 1 Jahr bei 62 % (47 % - 73 %) und bei einer Beschwerdedauer von > 1 Jahr bei 59 % (50 % - 65 %).

Es zeigt sich mit einem schwach negativen Korrelationskoeffizienten $\tau = -0,06$ und einem $p = 0,638$ keine Korrelation der PZM-Ausprägung und der Beschwerdedauer im Kendall-Tau-b-Test.



Abb. 41: PZM-Ausprägung der unterschiedlichen Gewebekategorisierung. Die PZM-Ausprägung wurde anhand der Formel für den gewichteten Mittelwert für die PZM berechnet, hier liegt der Median der PZM-Ausprägung zwischen 61 % (beim akuten BSV, mäßig und ausgeprägt degeneriertem Gewebe) und 67 % (beim chronischen BSV). PZM = perizelluläre Matrix.

Die Ausprägung der PZM in den verschiedenen Geweben wies nahezu identische Werte für die verschiedenen Gewebetypen auf (siehe Tabelle 26).

Im Kruskal-Wallis-Test zeigte sich mit einem $p = 0,065$ kein signifikanter

Unterschied in der Ausprägung der PZM zwischen den fünf verschiedenen Gewebetypen. Angesichts des niedrigen p ist es durchaus möglich, dass bei einer höheren Fallzahl hier ein statistisch signifikanter Unterschied beobachtet werden kann.

Die Ergebnisse einer durchgeführten post-hoc Mann-Whitney-U-Analyse finden sich in Tabelle 26.

Tabelle 26: PZM-Ausprägung der unterschiedlich degenerierten Gewebetypen

	Traumagewebe	akuter BSV	chron. BSV	mäßige Degeneration	ausgeprägte Degeneration
Median (Minimum - Maximum)	62 % (50 – 64 %)	61 % (50 – 67 %)	67 % (64 – 73 %)	61 % (47 – 66 %)	61 % (49 – 66 %)
Kruskall-Wallis-Test	p = 0,065*				
Traumagewebe		p = 0,886**	p = 0,029**	p = 0,737**	p = 0,808**
akuter BSV	p = 0,886**		p = 0,114**	p = 0,737**	p = 0,993**
chronischer BSV	p = 0,029**	p = 0,114**		p = 0,001**	p = 0,008**
mäßige Degeneration	p = 0,737**	p = 0,737**	p = 0,001**		p = 0,823**
ausgeprägte Degeneration	p = 0,808**	p = 0,993**	p = 0,008**	p = 0,823**	

Tabelle 26 zeigt die Ausprägung der PZM mittels Median (Minimum - Maximum) der unterschiedlich degenerierten Gewebetypen. Zudem wird das nicht signifikante Ergebnis des Kruskal-Wallis-Tests* gezeigt mit einem p = 0,065 und die p-Werte der post-hoc-Testungen mittels Mann-Whitney-U-Testung**. BSV = Bandscheibenvorfall, PZM = perizelluläre Matrix.

4 Diskussion

Diese Arbeit soll die Rolle der perizellulären Matrix bei mechanischer Belastung im Annulus fibrosus der Bandscheibe näher beleuchten. Dazu wurde humanes Bandscheibengewebe unbelastet und belastet untersucht. Die durchgeführte Belastung war eine einmalige Kompression des Bandscheibengewebes um 50 % der Ursprungshöhe. Unter Maßgabe, dass diese Belastung ausreicht eine erhöhte Zelltodrate auszulösen, wurde die Ausprägung der perizellulären Matrix der lebenden und toten Zellen, sowie die perizelluläre Matrix in unterschiedlich degeneriertem Gewebe näher analysiert. Es sollte die Hypothese überprüft werden, dass das Überleben der Chondrozyten in der humanen Bandscheibe abhängig von der Ausprägung der perizellulären Matrix ist.

4.1 Repräsentative Stichprobe

Miller et al führten 1988 eine Studie mit 600 Bandscheibenproben obduzierter Patienten durch, hierbei zeigten sich gehäuft degenerative Veränderungen in den Bandscheibenfächern LWK 4/5 und LWK 3/4 im Vergleich mit den anderen Bandscheibenfächern⁴⁵. Die in dieser Arbeit verwendeten Bandscheibenproben entstammen hauptsächlich diesen Bandscheibenfächern und bilden somit eine repräsentative Stichprobe degenerierten Bandscheibengewebes.

4.2 Zwischen der Probenhöhe und der Dichte der toten Zellen in der humanen Bandscheibe besteht keine Korrelation

Zur Ergebnisergebnisgewinnung wurden in dieser Arbeit abhängig von der Gewebequalität Probenzylinder unterschiedlicher Höhe mechanisch belastet und ausgewertet. Um die Ergebnisse dieser Arbeit als belastbar werten zu können, war entscheidend, dass nicht die Höhe der einzelnen Proben für die

Rate an abgestorbenen Zellen der ausschlaggebende Faktor war. In der Korrelationstestung nach Spearman-Rho zwischen Probenhöhe und Dichte der toten Zellen, konnte bei einer ausreichend großen Fallzahl von 52 belasteten Probenzylindern jedoch keine solche Korrelation nachgewiesen werden.

4.3 Die Zelldichte in der humanen Bandscheibe ist konstant unabhängig von Belastung und Gewebequalität

Da die Probenzylinder einer Bandscheibe zufällig verteilt wurden in belastet und unbelastet und somit jeweils vergleichbares Gewebe getestet wurde, kann von einer ausgeglichenen Zelldichte in den ausgewerteten Zylindern ausgegangen werden. In der Testung nach Wilcoxon, in die 96 ausgewertete Zylinder einfließen, zeigte sich auch kein signifikanter Unterschied zwischen den unbelasteten und belasteten Gewebeproben.

Durch die durchgeführte Belastung verschwinden also keine Zellen komplett aus der Auswertung. Daraus folgt, dass die unbelasteten und belasteten Gewebeproben bezüglich der Zelldichte vergleichbar sind und somit alle weiteren Ergebnisse auf dem gleichen Ausgangsniveau beruhen.

Die Zelldichte zeigte sich in der Korrelationsanalyse nach Kendall-Tau-b ebenfalls unabhängig von Haptik und Gewebedichte. Mit im Median etwa 100 Zellen/mm² war die Zelldichte in dieser Studie für alle untersuchten Gewebequalitäten ähnlich. Bei einer Schnittdicke von 70 µm ergibt sich somit eine durchschnittliche Zelldichte von 3×10^6 Zellen/cm³. Cassinelli et al. beschrieben im Jahr 2000 eine Zelldichte von 9×10^6 Zellen/cm³ im Annulus fibrosus¹⁸, somit zeigen die hier gewonnenen Ergebnisse nur geringe Abweichungen zu den Angaben in der Literatur. Diese Abweichungen könnten mit dem Alter der Patienten, welche in die Studie eingeschlossen worden sind zusammenhängen. Höhere Werte in der Zelldichte ergaben sich für locker fasriges Gewebe (Gewebedichte), allerdings lag hier die Fallzahl der ausgewerteten Zylinder bei lediglich zwei Zylindern, womit das Ergebnis in diesem Fall nur eingeschränkt interpretierbar ist. Wie unter anderem W.

Johnson et al. 2001 in ihrer Studie über die Bildung von Zellclustern in degeneriertem lumbalen Bandscheibengewebe berichteten, geht man in der degenerierten Bandscheibe von einer erhöhten Zellproliferation clusterbildender Zellen aus⁴⁶. Möglicherweise werden die Zellen, die außerhalb dieser Cluster in degeneriertem Bandscheibengewebe liegen, gleichermaßen weniger, wodurch sich die Zelldichte an sich nicht ändert.

In der hier untersuchten Stichprobe zeigten sich die meisten Zellen im chronischen Bandscheibenvorfall mit 139 Zellen/mm², gefolgt von der mäßigen Degeneration (116 Zellen/mm²), Traumagewebe (91 Zellen/mm²) und dem Gewebe ausgeprägter Degeneration (81 Zellen/mm²). Die geringste Zelldichte fand sich im Gewebe des akuten Bandscheibenvorfalles (59 Zellen/mm²), wobei dies daran liegen könnte, dass hier möglicherweise teilweise Nucleusgewebe bzw. Gewebe der Übergangszone mit ausgewertet wurde. Das Gewebe untersuchter akuter Bandscheibenvorfälle stammte vorzüglich von jungen Probanden. Hier wurde versucht möglichst wenig Gewebe zu entfernen, also hauptsächlich Nucleusgewebe und weniger Gewebe des Annulus fibrosus.

Dieses Ergebnis stimmt überein mit dem Vorkommen an Zellclustern in den hier ausgewerteten Gewebeprobe. Die meisten Zellcluster in den untersuchten unterschiedlich degenerierten Geweben fanden sich im Gewebe des chronischen Bandscheibenvorfalles und dem mäßig degenerierten Gewebe. Auch wenn in degeneriertem Gewebe zunehmend Zellen nekrotisch werden, aufgrund der schlechteren Versorgung des Bandscheibengewebes mit Nährstoffen¹⁴, tragen vor allem proliferierende Zellen in Clustern wohl zu einer höheren Dichte an Zellen bei, trotz der erhöhten Apoptoserate.

4.4 Belastung fördert die Apoptose der Zellen

Mechanische Belastung des humanen Bandscheibengewebes führt zu degenerativ chronischen Prozessen⁴. Ist das Bandscheibengewebe bereits geschädigt, reagiert es mit vermehrtem Zelltod. Je mehr Gewebe um die Zelle herum bereits geschädigt ist, desto höhere Kräfte wirken auf die Zelle, mit in der

Folge weiterer Zellschädigung bis hin zum Zelltod. In dieser Studie wurde bereits vorgeschädigtes Bandscheibengewebe zum Teil nochmals einmalig belastet mit einer Kompression von 50 % der Ursprungshöhe über eine Sekunde, der andere Teil blieb zum Vergleich unbelastet.

Grace D. O'Connell et al. zeigten 2010 in einer Studie, dass bei einer Belastung von 1000 N (~ 0,5 MPa) die Bandscheibe um 4,5 % komprimiert wird⁴⁷. Diese als moderat definierte Belastung entspricht nach Wilke et al. entspanntem Stehen⁴⁸. Somit ist die in dieser Studie angewandte Belastung, aus der eine Kompression von 50 % resultiert sicherlich als hohe Belastung einzuschätzen, welche aber im ventralen Randbereich der Bandscheibe bei maximaler Inklination denkbar ist. Die in einer Studie von Wilke et al. 1999 stärkste getestete Belastung mit 2,3 MPa auf unsere Wirbelsäule stellte das Heben von 20 kg mit rundem Rücken dar⁴⁸.

Nach der angewandten Belastung konnten signifikant mehr tote Zellen im belasteten Gewebe im Vergleich zum unbelasteten Gewebe gefunden werden. Hiermit konnte gezeigt werden, dass bereits eine einmalige Belastung bei bereits vorgeschädigtem Gewebe ausreicht weitere Gewebeschäden hervorzurufen. Bereits Grace D. O'Connell et al. zeigten 2010, dass die wirkenden Kräfte im degenerierten Gewebe deutlich zunahmen⁴⁷.

Die gewählte Kompressionshöhe kann also insofern als für die Fragestellung ausreichend gewertet werden, da der Effekt der Kompression im Sinne einer vermehrten Apoptoserate klar erkennbar war.

In dieser Studie wurde eine einmalige Belastung des Gewebes durchgeführt. Unklar ist, ob eine wiederholende Belastung mehr Schaden verursacht hätte. Allerdings wäre aufgrund der Gewebekonsistenz nicht immer eine wiederholende Belastung möglich gewesen, da das Gewebe bereits zu vorgeschädigt und wenig elastisch war und nach einmaliger Kompression bereits häufig eine Deformierung des Gewebes vorlag.

Auch unbelastetes Gewebe wies bereits einen gewissen Anteil toter Zellen auf. Diese Basisrate an toten Zellen wurde als Effekt der OP gewertet und der damit einhergehenden mechanischen Gewebeschädigung.

Wichtig zur Differenzierung der Belastung als tatsächliche Ursache für

vermehrten Zelltod in belastetem Gewebe war auch noch die Auswertung des gesunden Gewebes des getesteten Wasserbüffels. Auch hier konnte ein signifikant höherer Anteil an toten Zellen im belasteten Gewebe im Vergleich zum unbelasteten Gewebe gemessen werden. Wobei der Effekt der Belastung als Ursache der toten Zellen wiederum bestätigt wurde.

Auffallend war im humanen und auch im bovinen Gewebe, dass vor allem Zellen mit weniger gut ausgeprägter PZM starben. Dieser Punkt wird im Folgenden noch genauer beleuchtet.

4.5 Schädigungsanfälligkeit unterschiedlich degenerierter Gewebe

Da Gewebe abhängig von der bereits vorhandenen Degeneration mehr bzw. weniger vorgeschädigt ist, liegt es nahe, dass auch die Schädigungsanfälligkeit abhängig von der bereits bestehenden Degeneration differiert. In dieser Arbeit wurde die Schädigungsanfälligkeit anhand der toten Zellen in den belasteten Bandscheiben gemessen. Die Dichte toter Zellen im unbelasteten und belasteten Gewebe zeigte allerdings keine Korrelation mit dem Degenerationsgrad des Gewebes.

4.6 Einzelne Zellen und Paare sind die Hauptorganisationsform in der humanen Bandscheibe

Bisher wurde die Zellorganisation in der humanen Bandscheibe noch wenig beleuchtet. Rolauffs et al. zeigten 2009, dass die Hauptformationen der Zellen des Gelenkknorpels strings, Cluster, Paare und einzelne Zellen sind⁴⁹.

In dieser Arbeit konnten in den ausgewerteten Gewebeproben vor allem die Organisationsform in einzelne Zellen und Paare nachgewiesen werden.

Betrachtet man die Zelldichte in den Mustern, formierten sich die Zellen hauptsächlich noch, neben einzelnen Zellen und Paaren, in kleine und mittlere Cluster. Strings und double strings konnten nur sehr selten beobachtet werden.

Da das verwendete Bandscheibengewebe bereits vorgeschädigt war und allgemein bekannt ist, dass Degeneration Clusterbildung fördert, decken sich diese Daten mit der bisherigen Literatur zu diesem Thema.

Im ebenfalls untersuchten gesunden Rindergewebe schienen die Hauptzellformationen einzelne Zellen, gefolgt von strings und Paaren zu sein. Cluster und double strings wurden nicht gesehen.

Im Vergleich zum Gelenkknorpel scheint die Organisation in strings und in der Folge entsprechend dann auch double strings nicht typisch für die humane Bandscheibe zu sein. Zu beachten gilt es allerdings, dass die optische Eindringtiefe des Fluoreszenzlichtes im Faserknorpel wesentlich schlechter ist als im Gelenkknorpel. Möglicherweise sind also die in dieser Arbeit gesehenen Paare und einzelne Zellen Teile von strings bzw. double strings. Was allerdings gegen diese These spricht, ist, dass strings im Faserknorpel des Rindes beobachtet werden konnten und die Kollagenfasern aufgrund der Vitalität hier eher noch dichter als die der humanen Bandscheibe aneinander lagen.

Um diese Unklarheiten zu beseitigen, müssten andere Bildgebungsverfahren wie beispielsweise die konfokale Mikroskopie oder auch die Mikro-CT angewendet werden. Allerdings ist bereits aus dem Gelenkknorpel beschrieben, dass die Hauptorganisationsform der Zellen abhängig ist von der angelegten biomechanischen Beanspruchung eines Gelenkes. Rolaufts et al. konnten zeigen, dass signifikante Korrelationen zwischen einzeln vorkommenden Chondrozyten und Paaren mit uniaxialen Scharniergelenken bestehen. Zudem konnten sie auch zeigen, dass signifikante Korrelationen zwischen Clustern und konkav geformten Gelenkoberflächen bestehen, sowie ein gehäuftes Auftreten von strings in Gelenken mit einer Rotationsachse⁴⁹. Betrachtet man den Bewegungsspielraum der Wirbelsäule mit Ventralflexion, Dorsalextension, Lateralflexion, Rotation, sowie Kompression, Dehnung und translatorischer Verschiebung müssten gehäuft einzelne Zellen, Paare und Cluster zu finden sein. Dies deckt sich mit den Untersuchungsergebnissen dieser Studie. Da die Wirbelkörper konkav geformte Oberflächen bilden, finden sich vermutlich weniger strings in der Bandscheibe.

4.7 Der Grad der Degeneration des Gewebes besitzt Einfluss auf die Organisation der Zellen in verschiedene Muster

Abhängig vom Grad der Degeneration beschrieben unter anderem Lori A. Setton et al.²², dass bei voranschreitender Degeneration immer mehr Zellen proliferieren und es zur Clusterbildung kommt. Anhand des Kruskal-Wallis-Tests konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein signifikanter Unterschied in der Zellorganisation abhängig vom Grad der Degeneration besteht. Vor allem über einen längeren Zeitraum stärker geschädigtes Gewebe (mäßige und ausgeprägte Degeneration) differierte signifikant von akut weniger lange geschädigtem Gewebe (Trauma, akuter/chronischer Bandscheibenvorfall). Auffällig war allerdings, dass es in den hier vorliegenden Ergebnissen zunächst zu einem Anstieg der Cluster und somit der Zelldichte in stärker degeneriertem Gewebe kam. Ausgeprägt degeneriertes Gewebe wies wiederum eine geringere Zelldichte, weniger Zellen in Clustern jedoch wieder mehr einzeln liegende Zellen auf. Die geringere Zelldichte könnte, wie bereits oben erwähnt, an der generell schlechteren Versorgung der Bandscheibe mit Nährstoffen und der damit einhergehenden vermehrten Apoptose der Zellen liegen. Ein weiterer Grund, der später noch genauer erläutert wird, wäre die spärlicher vorhandene PZM in Clustern, wodurch die Zellen schlechter geschützt sind und schneller apoptotisch werden.

Ergänzend wurde eine Korrelationsanalyse nach Kendall-Tau-b durchgeführt die eine schwache, aber signifikante Korrelation zwischen der vorkommenden Musterorganisation der Zellen und den untersuchten Geweben unterschiedlicher Degeneration zeigte. Daraus folgt wiederum, dass der Grad der Degeneration Einfluss auf die Zellorganisation besitzt.

4.8 Bei Belastung werden vor allem gesunde Zellformationen angegriffen

Analysiert man die lebenden und toten Zellen in den einzelnen Mustern in unbelastetem und belastetem Bandscheibengewebe, zeigte sich in den humanen Gewebeproben im Wilcoxon-Test ein signifikanter Unterschied lediglich bei einzelnen Zellen und Paaren. Dieses Ergebnis könnte darauf hindeuten, dass durch Belastung vor allem gesunde Zellformationen angegriffen werden.

Allerdings wurden generell nur sehr wenige große Cluster in den untersuchten Proben gefunden, somit ist die Fallzahl der ausgewerteten Zellformationen in Clustern deutlich geringer als die einzeln liegender Zellen und Paare. Zudem ergaben sich in den untersuchten bovinen Gewebeproben keine signifikanten Unterschiede zwischen lebenden und toten Zellen in den einzelnen Mustern zwischen unbelastetem und belastetem Gewebe. Der vorliegende Datensatz erlaubt hier also noch keine abschließende Einschätzung.

4.9 Durch Belastung wird PZM abgebaut

Bisherige Studien zeigten vor allem, dass die PZM im Nucleusgewebe bei Belastung eine wichtige Rolle einnimmt. S. Roberts et al. beschrieben 1991, dass Nucleuszellen, aufgrund der höheren auf sie wirkenden axialen Belastung im Vergleich zu den Annuluszellen, eine besser sichtbare PZM besitzen⁶. In dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Annuluszellen eine deutlich ausgeprägte PZM besitzen. Die unterschiedliche Orientierung dieser PZM mit Einbettung in das umgebende Kollagenfasengerüst macht eine wertende quantitative Aussage im Vergleich zu Nucleuszellen jedoch schwierig. Es wird davon ausgegangen, dass es bei Belastung zu Zell-Matrix-Interaktionen in der perizellulären Matrix kommt, wodurch der Transport von Makromolekülen und die lokale Gewebespannung um die Zelle herum beeinflusst wird²⁶. Neben der Funktion als Belastungssensor, soll die perizelluläre Matrix die Zelle direkt

durch ihre Steifigkeit bei Druckbelastung vor Verformung schützen³⁰. In degenerativ verändertem Knorpelgewebe ist die PZM in veränderter Form vorhanden¹¹ bzw. wie in den hier untersuchten Gewebeproben in Clustern kaum mehr vorhanden. Wobei der Grad der Degeneration gemessen an der Ausprägung der PZM ein Indikator für Gewebeschädigung ist.

Belastete Gewebeproben zeigten signifikant weniger Matrix um die Zellen herum, als unbelastete Gewebeproben. Dieses Ergebnis ist kritisch zu betrachten, da kaum denkbar ist, dass eine einmalige mechanische Belastung die Epitope des Kollagen VI der PZM in solchem Ausmaß zerstört, dass der verwendete Antikörper Col-VIA3 nicht mehr daran andocken kann. Eher denkbar wäre eine enzymatische Zerstörung der Epitope. Durch die Belastung sterben mehr Zellen, wobei Zytokine ausgeschüttet werden und es zu einer Entzündungsreaktion kommt. Die hierbei vermehrt anfallende Kollagenase wiederum könnte das Kollagen VI der PZM abbauen wodurch die PZM verloren ginge.

Da die PZM als Schutz der Zelle zu betrachten ist, wirkt eine höhere Kraft auf die PZM, als auf die Zelle, wodurch diese vor der Zelle geschädigt werden sollte. Wiederum fraglich ist, ob eine einmalige Belastung ausreicht, die PZM und damit auch die folglich schutzlose Zelle dermaßen zu schädigen, dass diese die Matrixproduktion einstellt und apoptotisch wird. Allerdings ist die PZM in den hier verwendeten degenerierten Gewebeproben schon vorgeschädigt und weniger belastbar als in gesundem Gewebe. Hiermit könnte eine schnellere Schädigung der Zelle erklärt werden, wodurch diese keine Matrix mehr nachbilden kann und apoptotisch wird.

Vergleichend wurde beim gesunden Gewebe des Wasserbüffels kein signifikanter Unterschied in der Ausprägung der PZM zwischen unbelastetem und belastetem Gewebe gefunden. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass in gesundem Gewebe die PZM widerstandsfähiger auf Belastung reagiert und somit die Zelle weiterhin geschützt bleibt. Allerdings wirken, wie bereits beschrieben, auf die bovine Wirbelsäule hohe Kräfte, wodurch die bovinen Bandscheiben vermutlich höhere Belastungen gewohnt sind. Zudem ist nicht auszuschließen, dass eine höhere Fallzahl das Ergebnis beeinflusst hätte.

4.10 Tote Zellen besitzen weniger PZM als noch lebende Zellen

Die PZM dient der Zelle als Schutz bei Belastung, fehlt der Zelle dieser Schutz besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass die Zelle unter mechanischer Belastung zugrunde geht. Dieses Phänomen wurde in dieser Studie beobachtet, denn es konnte eine signifikant geringere PZM-Ausprägung der toten Zellen im Vergleich zu den lebenden Zellen nachgewiesen werden.

Denkbar ist, dass der Effekt der geringeren PZM der toten Zellen insgesamt durch eine deutliche enzymatische Reduktion der PZM um die apoptotischen Zellen hervorgerufen wird. Wäre allerdings allein dieser Effekt für die geringere Ausprägung der PZM verantwortlich, sollte die PZM der lebenden Zellen in unbelasteten und belasteten Gewebeproben vergleichbar sein, dies ist nicht ganz der Fall. Allerdings muss hier beachtet werden, dass im belasteten Gewebe mehr tote Zellen und damit mehr enzymatische Reaktion vorhanden ist, welche gegebenenfalls auch auf die lebenden Zellen einen Effekt hat.

Zudem wurde deutlich, dass in den belasteten Gewebeproben Zellen mit noch stärker ausgeprägter PZM als in unbelasteten Gewebeproben, unabhängig vom Grad der Degeneration, starben. Um herauszufinden, ob dieses Ergebnis lediglich auf einem statistischen Effekt beruht oder einer vorkommenden Entzündungsreaktion durch vermehrte Apoptose, könnte man in den Gewebeproben nach Belastung entsprechende Entzündungsparameter, wie beispielsweise Interleukin-1 messen.

Das gleiche Bild wie im getesteten humanen Bandscheibengewebe zeigte sich auch in der gesunden Rinderbandscheibe und kann somit als Effekt der Belastung aufgefasst werden.

4.11 Die Ausprägung der PZM ist abhängig vom Degenerationsgrad des vorliegenden Gewebes

Bereits in frühen degenerativen Stadien sind die Kollagenfasern weniger dicht gepackt. Dadurch ist die perizelluläre Matrix einiger Zellen in anderer Form als im gesunden Gewebe vorhanden¹¹. Degeneration des Bandscheibengewebes kann Beschwerden auslösen, allerdings ließ sich keine Korrelation zwischen der Ausprägung der PZM im untersuchten Gewebe und der Beschwerdedauer in der Testung nach Kendall-Tau-b nachweisen. Die Beschwerdedauer allein ist daher kein Indiz für die Ausprägung der PZM und damit des Degenerationsgrades in dieser Studie.

Allerdings wurde in der Testung nach Kruskal-Wallis fast ein signifikanter Wert erreicht bei der Analyse der Ausprägung der PZM und dem Degenerationsgrad des Gewebes. Bei einem $p = 0,065$ hätte eine größere Fallzahl (hier $n = 20$ Bandscheiben) vermutlich einen signifikanten Wert ergeben. Wie schon bereits erwähnt, verändert sich die PZM bei Degeneration, zudem bilden sich durch Zellproliferation Cluster mit weniger PZM. Es ist also davon auszugehen, dass die PZM ein Marker des Degenerationsgrades darstellt.

Der Mann-Whitney-U-Test zeigte bereits einen signifikanten Wert zwischen der Ausprägung der PZM beim chronischem BSV und der mäßigen Degeneration. Diese beiden Gewebetypen zeigten also bereits einen deutlichen Unterschied in der Ausprägung der PZM. Mit einem $p = 0,114$ hätte sich bei einer größeren Fallzahl eventuell auch noch ein signifikanter Unterschied in der Ausprägung der PZM zwischen akutem und chronischen BSV ergeben.

4.12 Mögliche Therapieansätze regenerativer Knorpeltherapie

Beim Gelenkknorpel werden bereits seit einigen Jahren regenerative Therapieverfahren bei Knorpelschäden erfolgreich eingesetzt. Das Ziel dieser Verfahren ist die Ausbildung einer Arthrose zu verhindern bzw. zu verzögern durch frühzeitige Schadensreparatur. Unterschieden werden drei Grundtypen

knorpelregenerativer Verfahren: Die Mikrofrakturierung, sowie auch die autologe matrixinduzierte Chondrogenese sind Verfahren, welche Progenitorzellen mesenchymalen Ursprungs einsetzen. Diese können sich in verschiedene Gewebetypen differenzieren. Resultat ist in der Regel faserknorpeliges Ersatzgewebe. Angewandt werden auch Verfahren, welche auf der Transplantation von Gewebe basieren. Bei der osteochondralen Transplantation wird ein ausgereifter Knorpel-Knochen-Zylinder transplantiert, welcher qualitativ dem Ursprungsgewebe entspricht. Ein in Europa eher seltener angewandtes Verfahren ist die Transplantation von Allografts, welche vor allem bei großen Defekten eine Alternative zum endoprothetischen Gelenkersatz darstellen¹³.

Vor allem interessant auf dem Hintergrund dieser Arbeit basierend sind die phänotypisch differenzierten Verfahren, wie die autologe Chondrozytentransplantation. Hier wird gesundes Knorpelgewebe gewonnen und enzymatisch verdaut. Es folgt die Expansion und Multiplikation der Chondrozyten. Diese differenzierten Chondrozyten sind phänotypisch sehr stabil, wodurch ein hoher Differenzierungsgrad des Zielgewebes entsprechend hyalinem Knorpel erreicht wird¹³. Genau dieses Therapieverfahren könnte möglicherweise optimiert werden um eine verbesserte Qualität des Zielgewebes zu erreichen durch Chondronenverdau und somit Erhalt der perizellulären Matrix. Denn sollte sich zeigen, dass Chondrozyten nicht nur bessere biomechanische Belastbarkeit bei intakter PZM zeigen, sondern auch ein verbessertes Synthesepotential im Vergleich zu den bisher üblicherweise verwendeten, ihrer PZM beraubten, Chondrozyten, sollte überlegt werden bei der Transplantation solcher Zellen zukünftig auf Verfahren zurückzugreifen, welche den Chondrozyten ihre Matrix belassen.

5 Zusammenfassung

Wichtig für die Entwicklung und den Erhalt des Knorpelgewebes der Bandscheibe ist die Interaktion zwischen Chondrozyten (den Knorpelzellen) und deren extrazellulärer Matrix. Die perizelluläre Matrix, die als Teil der extrazellulären Matrix die Zelle vollständig umgibt, beeinflusst jedes Signal das die Zelle empfängt. Somit reguliert die perizelluläre Matrix die Präsentation biochemischer und biophysikalischer Faktoren und kontrolliert damit die Zellbiosynthese²⁶.

Es wird vermutet, dass diese Zell-Matrix-Interaktionen mit der perizellulären Matrix eine wichtige Rolle spielen bei der Zellantwort auf mechanische Belastung durch Beeinflussung des Transports von Makromolekülen und der lokalen Gewebespannung um die Zelle herum²⁶.

Bereits Broom und Myers betrachteten die perizelluläre Matrix als eine Art Belastungssensor, wodurch die Zelle eine metabolische Antwort auf Belastung geben kann⁹.

Nach aktuellem Wissenstand spricht also vieles dafür, dass die perizelluläre Matrix zum Schutz der Chondrozyten dient und dass sie als eine Art mechanischer Umwandler agiert, welcher die Chondrozyten unter Belastung beeinflusst.

In dieser Arbeit wurden Chondrozyten des äußeren Ringes der humanen Bandscheibe, dem Annulus fibrosus, unterschiedlich degenerierten Gewebes einmalig stark belastet. Hier konnte gezeigt werden, dass im humanen, bereits vorgeschädigten Bandscheibengewebe durch Belastung signifikant mehr Zellen sterben. Da auch ein Vergleich mit gesundem bovinem Gewebe zeigte, dass durch Belastung mehr Zellen sterben, kann dieses Ergebnis als Effekt der Belastung gewertet werden.

Zudem konnte gezeigt werden, dass die perizelluläre Matrix tatsächlich eine schützende Funktion für Chondrozyten bei Belastung übernimmt. Tote Zellen wiesen eine signifikant geringer ausgeprägte perizelluläre Matrix, mit folglich schwächerer Schutzfunktion, als noch lebende Zellen auf.

Zudem ergaben sich Hinweise darauf, dass Zellen in stärker degeneriertem

unbelastetem Gewebe eine geringere Ausprägung der perizellulären Matrix aufweisen, wodurch die perizelluläre Matrix als ein Indikator für Gewebeschädigung angesehen werden kann.

Die durchgeführten Untersuchungen ergaben zudem, dass Degeneration die Zellorganisation dermaßen beeinflusst, dass bestimmte Zellmuster neben der Ausprägung der perizellulären Matrix Hinweise auf den Grad der Gewebeschädigung geben können.

Gesundes Gewebe mit gut ausgeprägter perizellulärer Matrix kann Belastung ohne große Schädigung überstehen, da die Chondrozyten hier besser geschützt sind. Dies stellt einen neuen Aspekt in der Betrachtungsweise von Bandscheibengewebe dar, welcher auch bei der Entwicklung neuer regenerativer Therapieverfahren mit in Betracht gezogen werden sollte.

Die Untersuchungen unterstreichen die entscheidende Rolle der perizellulären Matrix für die Überlebensfähigkeit von Bandscheibenchondrozyten. Weitere Experimente sollten zusätzlich auch die Syntheseleistung von Zellen in Abhängigkeit ihrer perizellulären Matrix untersuchen. Sollte sich auch hier eine klare Überlegenheit der Zellen mit perizellulärer Matrix zeigen ist zu überlegen, ob bei der autologen Transplantation von Chondrozyten, welche bisher ohne perizelluläre Matrix erfolgt, diese nicht mit berücksichtigt werden sollte.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
B, b	belastet
BSV	Bandscheibenvorfall
BWK	Brustwirbelkörper
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DS	double strings
EZ	einzelne Zellen
ges.	gesamt
GC	großes Cluster
HWK	Halswirbelkörper
Kat. Nr.	Katalognummer
LWK	Lendenwirbelkörper
MC	mittleres Cluster
MRT	Magnetresonanztomografie
n	Anzahl
OP	Operationssaal
Pa	Paare
PBT	Phosphate-Buffered Saline + Tween
PFA	Paraformaldehyd
PZM	perizelluläre Matrix
SC	kleine Cluster
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
UB, ub	unbelastet
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

6.1 Einheiten und Größenordnungen

°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
h	Stunde
kDa	Kilodalton
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mm/s	Millimeter pro Sekunde
N	Newton
nm	Nanometer
s	Sekunde
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Aufbau der extrazellulären Matrix mit ihren Hauptbestandteilen und deren Anordnung.....	8
Abb 2.: Schematischer Aufbau der kollagenen Faser.....	9
Abb. 3: Zonen innerhalb der Extrazellulären Matrix der Bandscheibe.....	10
Abb. 4: Kraftwirkung in der belasteten Bandscheibe.....	14
Abb. 5: Wachstumszone in unterschiedlichen Spezies.....	19
Abb. 6: Wirbelsäulenapparat eines Rindes mit noch integrierten Bandscheiben	27
Abb. 7: Schneidegeräts	28
Abb. 8: Humane Probenzubereitung in der Petrischale.....	30
Abb. 9: Biomechanische Belastungsmaschine.....	31
Abb. 10: Deckel und Boden der Probenkammer	32
Abb. 11: Schematische Darstellung der Probenkammer mit Bandscheibenzylinder	32
Abb. 12: Kompressionskurven der Bandscheibenprobe in der Belastungsmaschine	33
Abb. 13: Emissions-und Exzitationskurven der verwendeten Farbstoffe zur Färbung lebender und toter Zellen	35
Abb. 14: Metallscheibe welche im Kryotom verwendet wird zur Einbettung der Probe	36
Abb. 15: Schneidevorgang mit dem Kryotom	37
Abb. 16: Geplatzte Zellen durch SDS 1%	39
Abb. 17: Perizelluläre Matrix mit Col-VIA3 unscharf angefärbt.....	39
Abb. 18: Darstellung der perizellulären Matrix im bovinen Gewebe.....	42
Abb. 19: Lebend-Tot-Fluoreszenzaufnahme.....	45
Abb. 20: Darstellung der perizellulären Matrix.....	46
Abb. 21: Pfirrmann-Score.....	48
Abb. 22 Lebende und tote Zellen, sowie deren perizelluläre Matrix	50
Abb. 23: Klinische Daten der untersuchten humanen Bandscheiben.....	56
Abb. 24: Untersuchte Bandscheibenzylinder und Gewebekategorisierung	58

Abb. 25: Zelldichte der Zellen im humanen Annulus fibrosus pro mm ² in unbelasteten und belasteten Proben.....	60
Abb. 26: Zelldichte im Annulus fibrosus nach Haptik und Gewebedichte	61
Abb. 27: Zelldichte pro mm ² der unterschiedlich degenerierten Gewebe	62
Abb. 28: Muster- und musterbezogene Zelldichte in den Mustern im humanen Bandscheibengewebe	64
Abb. 29: Muster- und musterbezogene Zelldichte in den Mustern im Bandscheibengewebe des Wasserbüffels.....	66
Abb. 30: Zelldichte im humanen Annulus fibrosus in Zellen/mm ² in den einzelnen Mustern abhängig vom Gewebezustand.....	68
Abb. 31: Dichte der lebenden und toten Zellen im humanen Annulus fibrosus in Zellen/mm ² in den einzelnen Zellmustern aufgeteilt nach unbelastetem und belastetem Gewebe.	71
Abb. 32: Zelldichte toter und lebender Zellen pro mm ² in den einzelnen Zellmustern belastungsabhängig in der Bandscheibe des Wasserbüffels.....	73
Abb. 33: Absolute Zelldichte bzw. prozentuale Zelldichte lebender und toter Zellen im humanen Annulus fibrosus in Abhängigkeit von Belastung.....	74
Abb. 34: Absolute Zelldichte bzw. prozentuale Zelldichte lebender und toter Zellen belastungsabhängig in der Bandscheibe des Wasserbüffels.....	76
Abb. 35: Zelldichte der toten Zellen im humanen Annulus fibrosus in Zellen/mm ² in %.	77
Abb. 36: Ausprägung der humanen perizellulären Matrix in unbelasteten und belasteten Proben	79
Abb. 37: PZM-Ausprägung belastungsabhängig in der Bandscheibe des Wasserbüffels.....	80
Abb. 38: PZM-Ausprägung der lebenden und toten Zellen	81
Abb. 39: PZM-Ausprägung lebender und toter Zellen in der Bandscheibe des Wasserbüffels.....	83
Abb. 40: PZM-Ausprägung der unterschiedlichen Beschwerdezeiträume.....	84
Abb. 41: PZM-Ausprägung der unterschiedlichen Gewebekategorisierung	85

Tabelle 1: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe	22
Tabelle 2: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper	22
Tabelle 3: Verwendeten Lösungen und Puffer	22
Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien	23
Tabelle 5: Verwendete Geräte	25
Tabelle 6: Verwendete Software	25
Tabelle 7: Verwendete Rinderproben	26
Tabelle 8: Verwendete humane Proben.....	29
Tabelle 9: Getestete Enzymkonzentrationen beim Verdau mit Kollagenase A .	40
Tabelle 10: humane Gewebeproben.....	54
Tabelle 11: ANOVA und Tukey-Testung der Zelldichte in unterschiedlich degeneriertem Gewebe	63
Tabelle 12: Muster in unbelasteten und belasteten Proben	65
Tabelle 13: Zelldichte in den Mustern unbelasteter und belasteter Proben	65
Tabelle 15: Zelldichte in den Mustern in unbelastetem und belastetem Gewebe des Wasserbüffels	67
Tabelle 16: Zellverteilung in den Mustern verschiedener Gewebetypen.....	69
Tabelle 17: Lebende und tote Zellen in den Gewebeproben belastungsabhängig	72
Tabelle 18: Tote Zellen in den unbelasteten bzw. belasteten Zellmustern	72
Tabelle 19: Lebende und tote Zellen in Gewebeproben belastungsabhängig beim Wasserbüffel.....	73
Tabelle 20: lebende und tote Zellen in unbelastetem und belastetem Gewebe	75
Tabelle 21: lebende und tote Zellen in unbelastetem und belastetem Gewebe des Wasserbüffels	77
Tabelle 22: PZM-Ausprägung in unbelasteten und belasteten Gewebeproben	79
Tabelle 23: PZM-Ausprägung in unbelasteten und belasteten Gewebeproben des Wasserbüffels	80
Tabelle 24: PZM-Ausprägung lebender und toter Zellen im gesamten, unbelasteten und belasteten Gewebe	82

Tabelle 25: PZM-Ausprägung lebender und toter Zellen im gesamten, unbelasteten und belasteten Gewebe des Wasserbüffels	84
Tabelle 26: PZM-Ausprägung der unterschiedlich degenerierten Gewebetypen	86

8 Firmenverzeichnis

Firma	Adresse
Aesculap AG	Am Aesculap-Platz, 78532 Tuttlingen www.bbraun.de
BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH	Pfullingerstr. 57, 72820 Sonnenbühl- Genkingen www.bdk-online.de
BINDER GmbH	Im Mittleren Ösch 5, 78532 Tuttlingen www.binder-world.com/de
Biochrom GmbH	Leonorenstr.2-6, 12247 Berlin www.biochrom.de
Biozym Scientific GmbH	Steinbrinksweg 27, 31840 Hessisch Oldendorf www.biozym.com
Carl Roth GmbH + Co. KG	Schoemperlenstraße 3-5, 76185 Karlsruhe www.carlroth.com/de/de
Carl Zeiss Microscopy GmbH	Carl-Zeiss-Promenade 10, 07745 Jena www.zeiss.de/microscopy
Corning Incorporated Life Sciences	One Becton Circle, Durham, NC 27712 USA www.corning.com
Dako Deutschland GmbH,	Neue Flora, Stresemannstraße 161, 22769 Hamburg www.dako.com
Dianova GmbH	Warburgstr. 45, 20354 Hamburg www.dianova.com
Dr. Schumacher GmbH	Am Roggenfeld 3, 34323 Malsfeld www.schumacher-online.com
Eppendorf AG	Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg www.eppendorf.com/DE-de
Glyph&Cog	Glyph & Cog, LLC, 185 H Street, Suite A Petaluma, CA 94952 USA www.glyphandcog.com
Greiner Bio-One GmbH	Maybachstraße 2, 72636 Frickenhausen www.greinerbioone.com
Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG	Hauptstraße 7 – 15, 74246 Eberstadt www.hirschmann-laborgeraete.de

Firma	Adresse
IBM Deutschland GmbH	IBM-Allee 1, 71139 Ehningen www.ibm.com/de/de
IKA®-Werke GmbH & CO. KG	Janke & Kunkel-Str. 10, 79219 Staufen www.ika.com
Labortechnik Medingen	Kleinwolmsdorfer Str. 26, 01477 Arnsdorf www.labortechnik-medingen.de
Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Mikroskopie und Histologie	Ernst-Leitz-Strasse 17-37, 35578 Wetzlar www.leica-microsystems.com
Life Technologies GmbH	Frankfurter Straße 129B in 64293 Darmstadt www.lifetechnologies.com/de
National Instruments	Ganghoferstr. 70b, 80339 München
PAUL HARTMANN AG	Paul-Hartmann-Str. 12, 89522 Heidenheim www.hartmann.de
pfm medical ag	Wankelstraße 60, 50996 Köln www.pfmmedical.com/de
R.Langenbrinck Labor-und Medizintechnik	Im Hausgrün 13, 79312 Emmendingen www-langenbrinck.com
Roche Diagnostics GmbH	Sandhoferstr. 116 in 68305 Mannheim www.roche.de
Sakura Finetek Europe B.V.,	Flemingweg 10A, 2408 AV Alphen aan den Rijn www.sakura.eu
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Bergheimer Str. 89-2 in 69115 Heidelberg www.scbt.com
Sarstedt AG & Co Kommanditgesellschaft	Sarstedtstraße 1, 51588 Nümbrecht www.sarstedt.com
Science Services GmbH	Unterhachinger Straße 75, 81737 München www.scienceservices.de
Sigma Aldrich Chemie GmbH	Riedstraße 2, 89555 Steinheim www.sigmaaldrich.com/germany.html
The Apache Software Foundation	1901 Munsey Drive, Forest Hill, MD 21050-2747, U.S.A www.apache.org

9 Aufklärungsbogen

 <p>Orthopädische Klinik. Hoppe-Seyler-Straße 3 · 72076 Tübingen</p>	<p><i>Universitätsklinikum Tübingen</i></p> <p>Orthopädische Klinik Ärztlicher Direktor Prof. Dr. med. N. Wülker</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 Rolauffs²
Tel: 07071-29 81120

Dr. med. Ulf K. Hofmann¹
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 verwerfen – 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>Orthopädische Klinik. Hoppe-Seyler-Straße 3 · 72076 Tübingen</p>	<p><i>Universitätsklinikum Tübingen</i></p> <p>Orthopädische Klinik Ärztlicher Direktor Prof. Dr. med. N. Wülker</p> <p>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 Rolauffs²
Tel: 07071-29 81120

Dr. med. Ulf K. Hofmann¹
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

Arzt / Ärztinname in Blockschrift

10 Quellen

1. Sivan SS, Hayes AJ, Wachtel E, et al. Biochemical composition and turnover of the extracellular matrix of the normal and degenerate intervertebral disc. *Eur Spine J*. 2014;23(SUPPL. 3):344-353. doi:10.1007/s00586-013-2767-8.
2. Poole C a, Flint MH, Beaumont BW. Morphological and functional interrelationships of articular cartilage matrices. *J Anat*. 1984;138 (Pt 1:113-138.
3. Aumüller, G., Aust, G., Doll, A., Engele, J., Kirsch., J., Mense, S., Wurzinger LJ. *Anatomie (Duale Reihe)*. 1. Auflage.; 2006.
4. Prescher A. Anatomy and pathology of the aging spine. *Eur J Radiol*. 1998. doi:10.1016/S0720-048X(97)00165-4.
5. Eyre DR, Matsui Y, Wu J-J. Collagen polymorphisms of the intervertebral disc. *Biochem Soc Trans*. 2002;30(Pt 6):844-848. doi:10.1042/BST0300844.
6. ROBERTS, S., BSc P, MENAGE J, Duance, V., BSc P, Wotton, S. Bs, Ayad, S., BSc P. Collagen types around the cells of the IVD and cartilage end plate.pdf. 1991.
7. Roberts S, Roberts S, Evans H, et al. Histology and Pathology of the Human Intervertebral Disc. 2009. doi:10.2106/JBJS.F.00019.
8. Chelberg MK, Banks GM, Geiger DF, Oegema TR. Identification of heterogeneous cell populations in normal human intervertebral disc. *J Anat*. 1995;186 (Pt 1:43-53.
9. Broom ND, Myers DB. A study of the structural response of wet hyaline cartilage to various loading situations. *Connect Tissue Res*. 1980;7(4):227-237. doi:10.3109/03008208009152358.
10. Adams MA, Dolan P. Spine biomechanics. *J Biomech*. 2005. doi:10.1016/j.jbiomech.2005.03.028.
11. Gruber HE, Ingram J a, Hanley EN. Morphologic complexity of the pericellular matrix in the annulus of the human intervertebral disc. *Biotech Histochem*. 2007;82(4):217-225. doi:10.1080/10520290701713999.
12. Rolaufts B, Williams JM, Aurich M, Grodzinsky AJ, Kuettner AE, Cole AA. Proliferative re-modeling of the spazial organisation of human superficial chondrocytes distant to focal early osteoarthritis (OA). *NIH Public Access*. 2012;62(2):489-498. doi:10.1002/art.27217
13. M. Steinwachs, S. Wopperer, G. Salzmann BW. Regenerative Knorpeltherapie. *Orthopädie und Unfallchirurgie*. 2014:279-301.
14. Buckwalter J a. Aging and degeneration of the human intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1995;20(11):1307-1314.
15. Whatley BR, Wen X. Intervertebral disc (IVD): Structure, degeneration, repair and regeneration. *Mater Sci Eng C*. 2012;32(2):61-77.

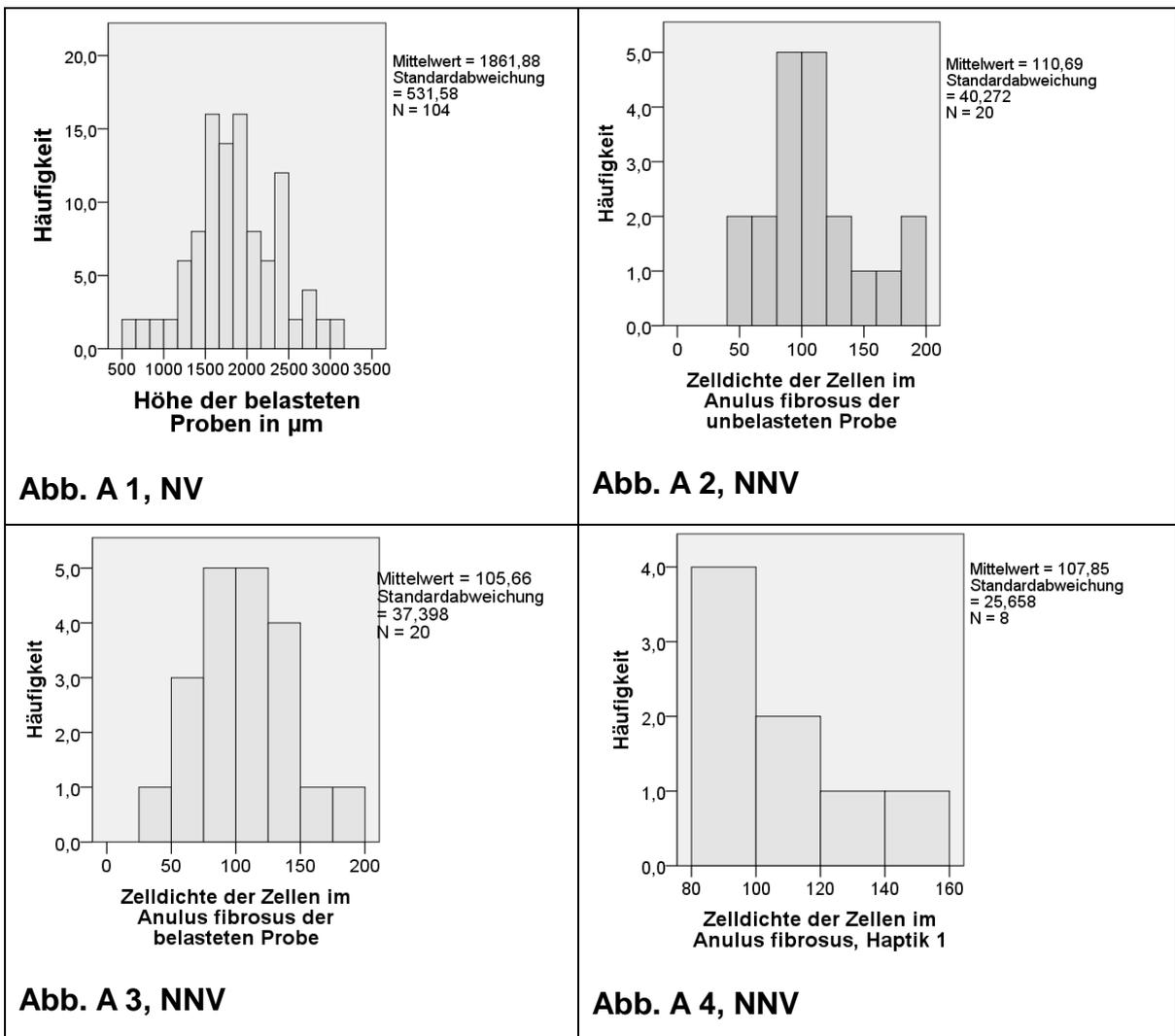
- doi:10.1016/j.msec.2011.10.011.16. Meachim G, Cornah MS. Fine structure of juvenile human nucleus pulposus. *J Anat.* 1970;107(Pt 2):337-350.
17. Pazzaglia UE, Salisbury JR, Byers PD. Development and involution of the notochord in the human spine. *J R Soc Med.* 1989;82(7):413-415.
 18. Cassinelli EH, Kang JD. Current Understanding of Lumbar Disc Degeneration. *October.* 2000;10(4):254-262. doi:10.1053/otor.2000.8400.
 19. Lv F, Leung VYL, Huang S, Huang Y, Sun Y, Cheung KMC. In search of nucleus pulposus-specific molecular markers. *Rheumatol (United Kingdom).* 2014;53(SEPTEMBER):600-610. doi:10.1093/rheumatology/ket303.
 20. Rufai a, Benjamin M, Ralphs JR. The development of fibrocartilage in the rat intervertebral disc. *Anat Embryol (Berl).* 1995;192(1):53-62. doi:10.1007/BF00186991.
 21. Roberts S. Disc morphology : the end of the production line. *Biochem Soc Trans.* 2002;30:864-869.
 22. Setton LA, Chen J. Mechanobiology of the intervertebral disc and relevance to disc degeneration. *J Bone Joint Surg Am.* 2006. doi:10.2106/JBJS.F.00001.
 23. S. ROBERTS, BSc P, MENAGE J, J.P.G. URBAN, BSc P. Biochemical and Structural Properties of the Cartilage End-Plate and its Relation to the IVD. *Spine (Phila Pa 1976).* 1989;21(3):166-174. doi:10.1097/00007632-199602010-00004.
 24. Hayes a. J, Benjamin M, Ralphs JR. Extracellular matrix in development of the intervertebral disc. *Matrix Biol.* 2001;20(2):107-121. doi:10.1016/S0945-053X(01)00125-1.
 25. Knight MM, Ross JM, Sherwin AF, Lee DA, Bader DL, Poole CA. Chondrocyte deformation within mechanically and enzymatically extracted chondrons compressed in agarose. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2001. doi:10.1016/S0304-4165(01)00118-0.
 26. Guilak F, Alexopoulos LG, Upton ML, et al. The pericellular matrix as a transducer of biomechanical and biochemical signals in articular cartilage. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1068(1):498-512. doi:10.1196/annals.1346.011.
 27. Santa Cruz Biotechnology. COL6A3 (N-12): sc-131140. *St Cruz Biotechnol.* 2015.
 28. Poole C a, Flint MH, Beaumont BW. Chondrons extracted from canine tibial cartilage: preliminary report on their isolation and structure. *J Orthop Res.* 1988;6(3):408-419. doi:10.1002/jor.1100060312.
 29. Pritchard S, Erickson GR, Guilak F. Hyperosmotically induced volume change and calcium signaling in intervertebral disk cells: the role of the actin cytoskeleton. *Biophys J.* 2002;83(5):2502-2510. doi:10.1016/S0006-3495(02)75261-2.

30. Knight MM, Lee DA, Bader DL. The influence of elaborated pericellular matrix on the deformation of isolated articular chondrocytes cultured in agarose. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 1998. doi:10.1016/S0167-4889(98)00102-5.
31. West ER, Xu M, Woodruff TK, Shea LD. Zonal changes in the three-dimensional morphology of the chondron under compression: The relationship among cellular, pericellular, and extracellular deformation in articular cartilage. *October.* 2008;28(30):4439-4448. doi:10.1037/a0013262.Open.
32. Setton LA. Cell mechanics and mechanobiology in the intervertebral disc. In: *European Cells and Materials.* ; 2005. doi:10.1097/01.brs.0000146050.57722.2a.
33. Boos N, Weissbach S, Rohrbach H, Weiler C, Spratt KF, Nerlich AG. Classification of age-related changes in lumbar intervertebral discs: 2002 Volvo Award in basic science. *Spine (Phila Pa 1976).* 2002;27(23):2631-2644. doi:10.1097/01.BRS.0000035304.27153.5B.
34. D.S. Bradford, T.R. Oegema, Jr., K.M. Cooper, K. Wakano EYC. *Chymopapain, Chemonucleolysis Und Nucleus Pulposus Regeneration. A Biochemical and Biomechanical Study.*; 1983.
35. Battié MC, Videman T, Gill K, Moneta GB. Smoking and lumbar intervertebral disc degeneration - an MRI study of identical twins. *Spine* 1991:1015-1021.
36. Battie MC, Videman T, Gibbons LE, Fisher LD, Manninen H, Gill K. Determinants of lumbar disc degeneration - a study relating lifetime exposures and magnetic-resonance-imaging findings in identical-twins. *Spine (Phila Pa 1976).* 1995;20(24):2601-2612.
37. Malcolm H. Pope. Low back pain and whole body vibration. *Clin Orthop Relat Res.* 1995;(320):247-278. doi:10.1097/01.blo.0000076804.53006.dc.
38. Hunter CJ, Matyas JR, Duncan N a. The notochordal cell in the nucleus pulposus: a review in the context of tissue engineering. *Tissue Eng.* 2003;9(4):667-677. doi:10.1089/107632703768247368.
39. Alini M, Eisenstein SM, Ito K, et al. Are animal models useful for studying human disc disorders/degeneration? *Eur Spine J.* 2008. doi:10.1007/s00586-007-0414-y.
40. Cotterill PC, Kostuik JP, D'Angelo G, Fernie GR, Maki BE. An anatomical comparison of the human and bovine thoracolumbar spine. *J Orthop Res.* 1986;4(3):298-303. doi:10.1002/jor.1100040306.
41. Elliott DM, Sarver JJ. Young investigator award winner: validation of the mouse and rat disc as mechanical models of the human lumbar disc. *Spine (Phila Pa 1976).* 2004;29(7):713-722. doi:10.1097/01.BRS.0000116982.19331.EA.
42. Frank EH, Jin M, Loening AM, Levenston ME, Grodzinsky AJ. A versatile shear and compression apparatus for mechanical stimulation of tissue culture explants. *J Biomech.* 2000. doi:10.1016/S0021-9290(00)00100-7.

43. Lichtman JW, Conchello J-A. Fluorescence microscopy. *Nat Methods*. 2005;2(12):910-919. doi:10.1038/nmeth817.
44. Pfirrmann CW, Metzdorf A, Zanetti M, Hodler J, Boos N. Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2001. doi:10.1097/00007632-200109010-00011.
45. Miller J a, Schmatz C, Schultz a B. Lumbar disc degeneration: correlation with age, sex, and spine level in 600 autopsy specimens. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1988;13(2):173-178. doi:10.1097/00007632-198802000-00008.
46. Johnson WE, Eisenstein SM, Roberts S. Cell cluster formation in degenerate lumbar intervertebral discs is associated with increased disc cell proliferation. *Connect Tissue Res*. 2001;42(3):197-207. doi:10.3109/03008200109005650.
47. O'Connell GD, Vresilovic EJ, Elliott DM. Human intervertebral disc internal strain in compression: the effect of disc region, loading position, and degeneration. *J Orthop Res*. 2011;29(4):547-555. doi:10.1002/jor.21232.
48. Wilke HJ, Neef P, Caimi M, Hoogland T, Claes LE. New in vivo measurements of pressures in the intervertebral disc in daily life. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1999. doi:10.1097/00007632-199904150-00005.
49. Rolauffs B, Williams JM, Grodzinsky AJ, Kuettner KE, Cole A a. Distinct horizontal patterns in the spatial organization of superficial zone chondrocytes of human joints. *NIH Public Access*. 2009;162(2):335-344. doi:10.1016/j.jsb.2008.01.010.

11 Anhang

Die hier dargestellten Graphiken dienen nicht zur Werteanalyse, da diese schon in der Arbeit selbst erfolgt ist, sondern ausschließlich der Beurteilung der Datenverteilung in normalverteilt (NV) und nicht normalverteilt (NNV).



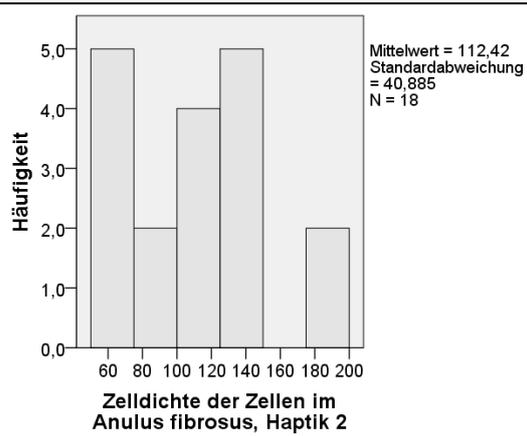


Abb. A 5, NNV

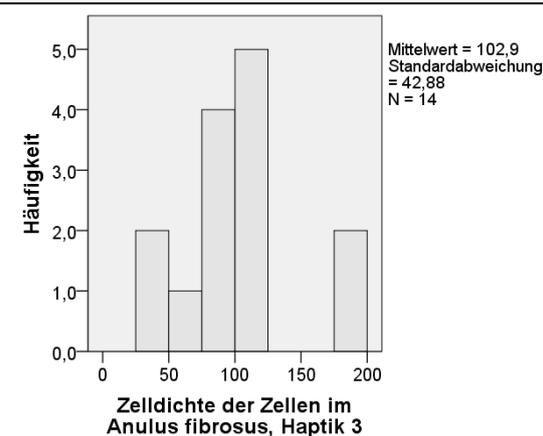


Abb. A 6, NNV

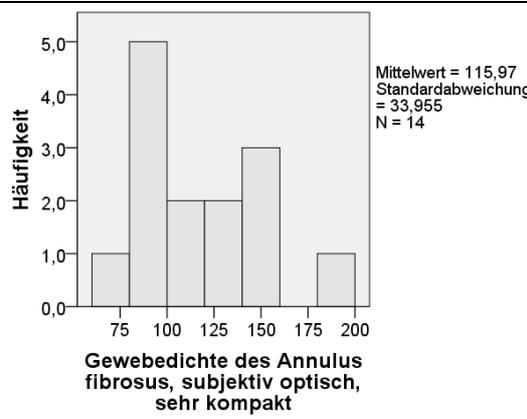


Abb. A 7, NNV

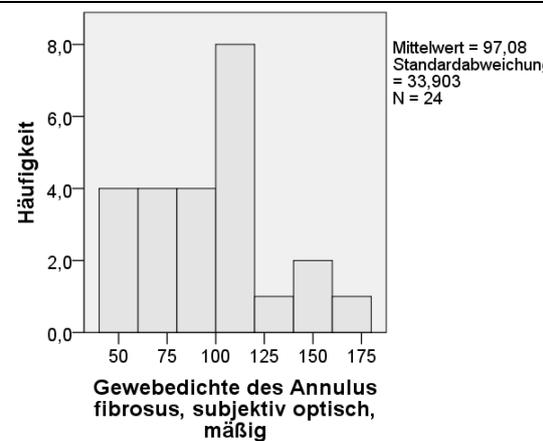


Abb. A 8, NNV

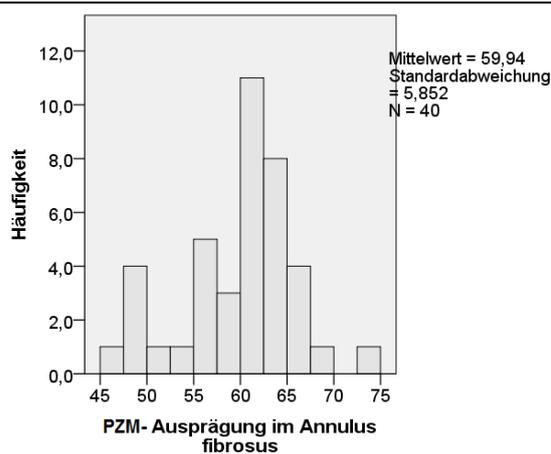


Abb. A 9, NNV

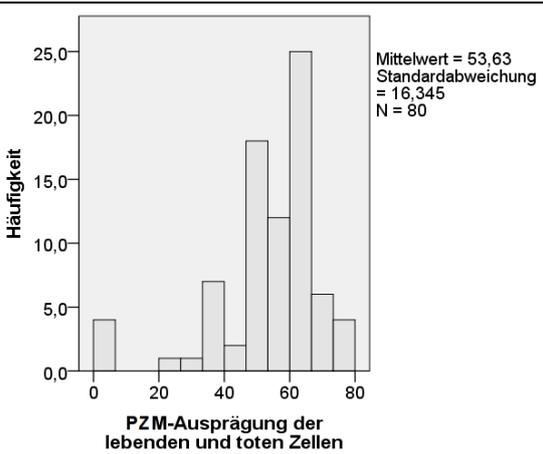


Abb. A 10, NNV

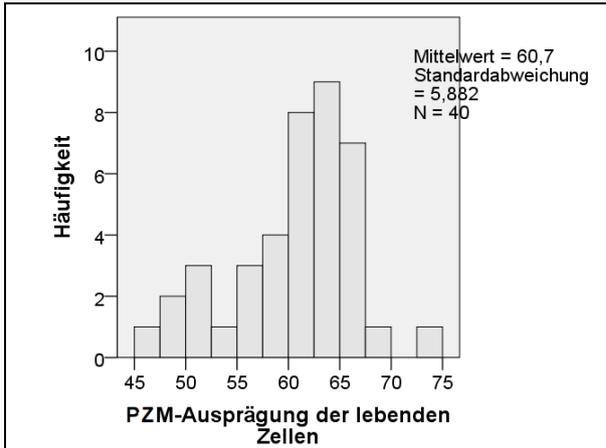


Abb. A 11, NNV

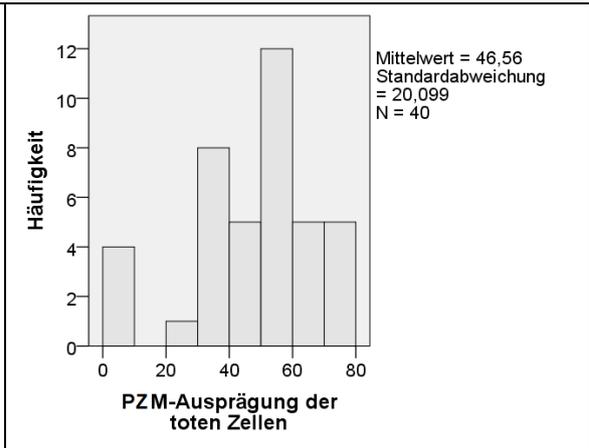


Abb. A 12, NNV

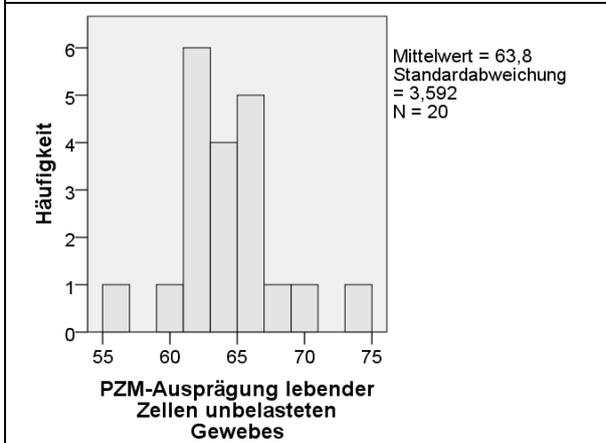


Abb. A 13, NNV

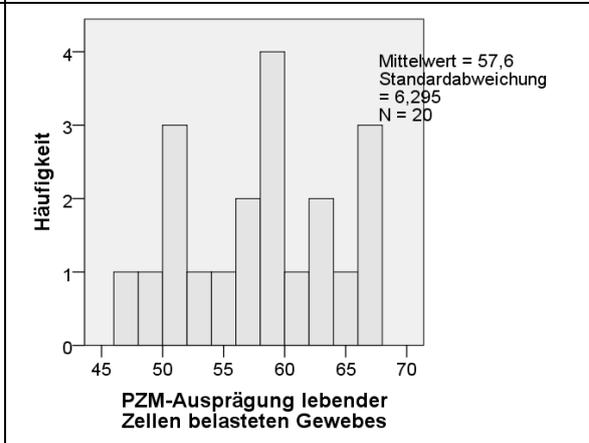


Abb. A 14, NNV

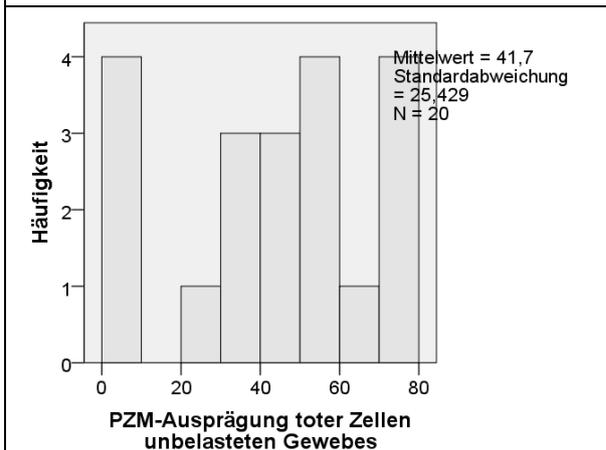


Abb. A 15, NNV

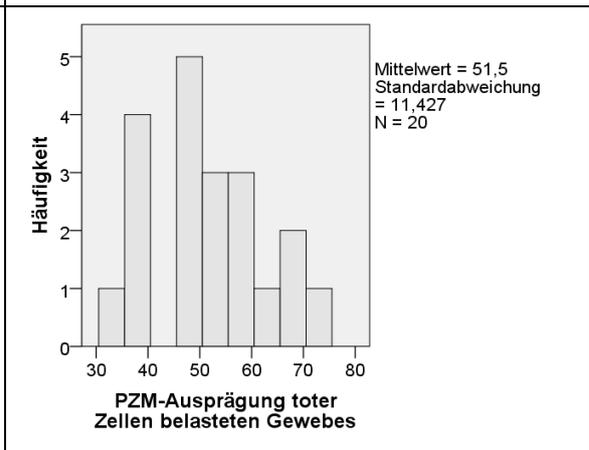
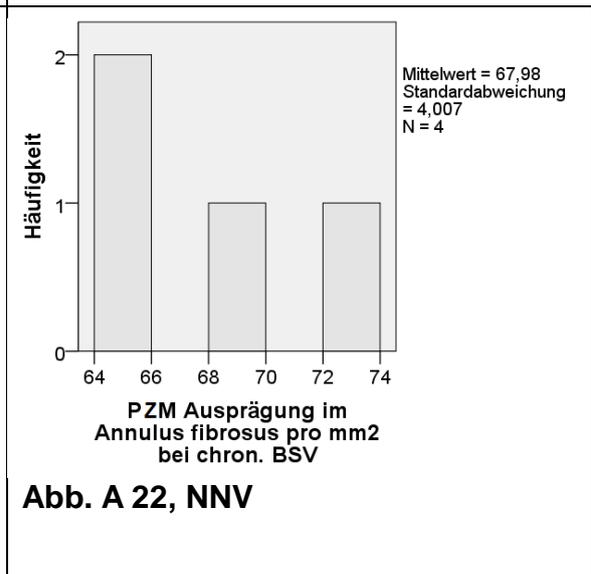
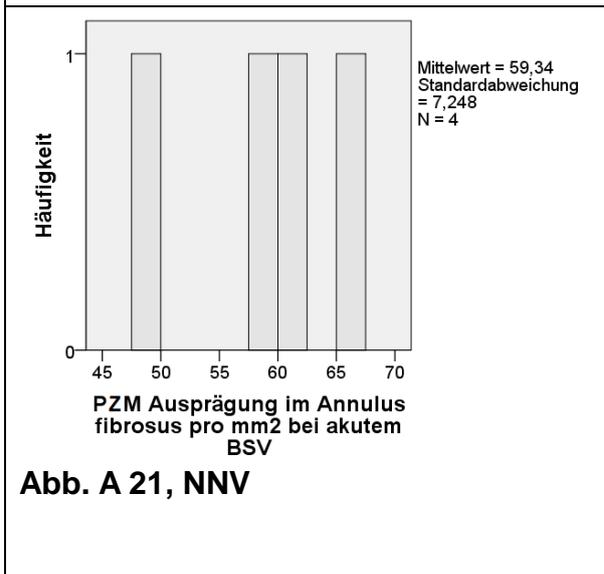
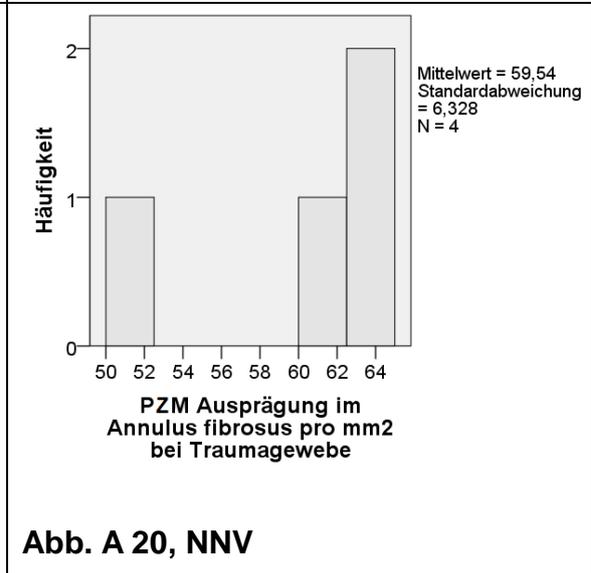
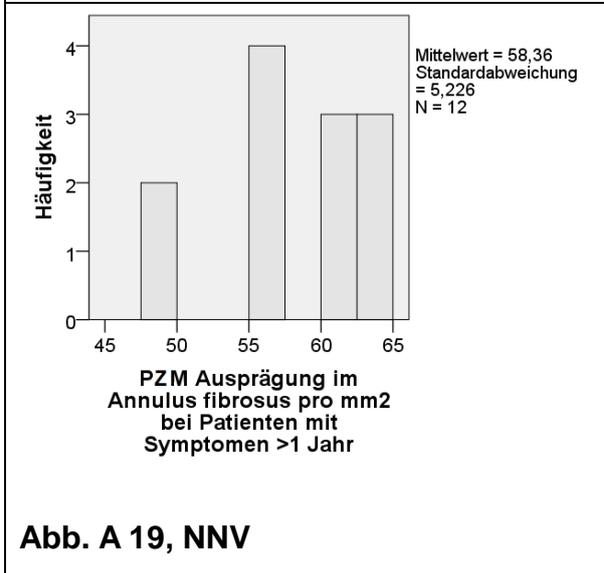
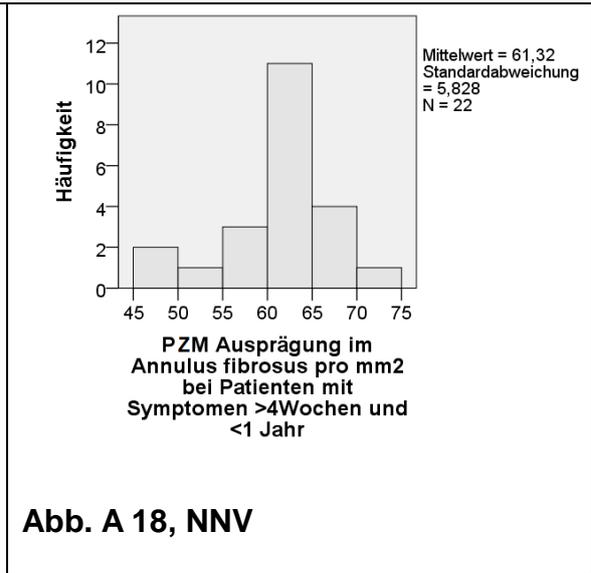
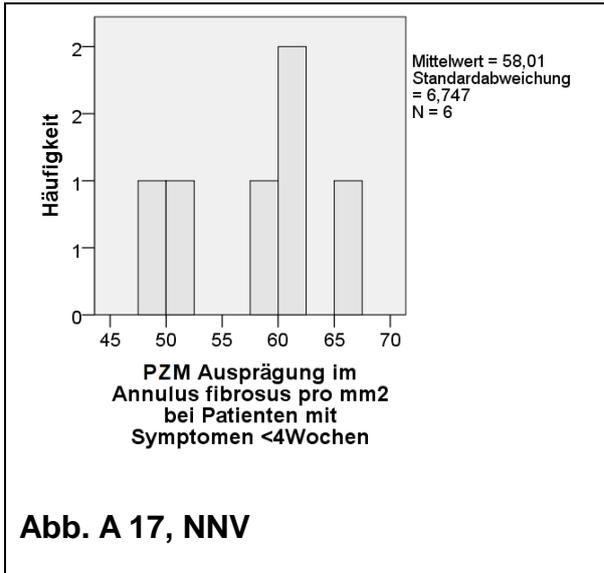


Abb. A 16, NNV



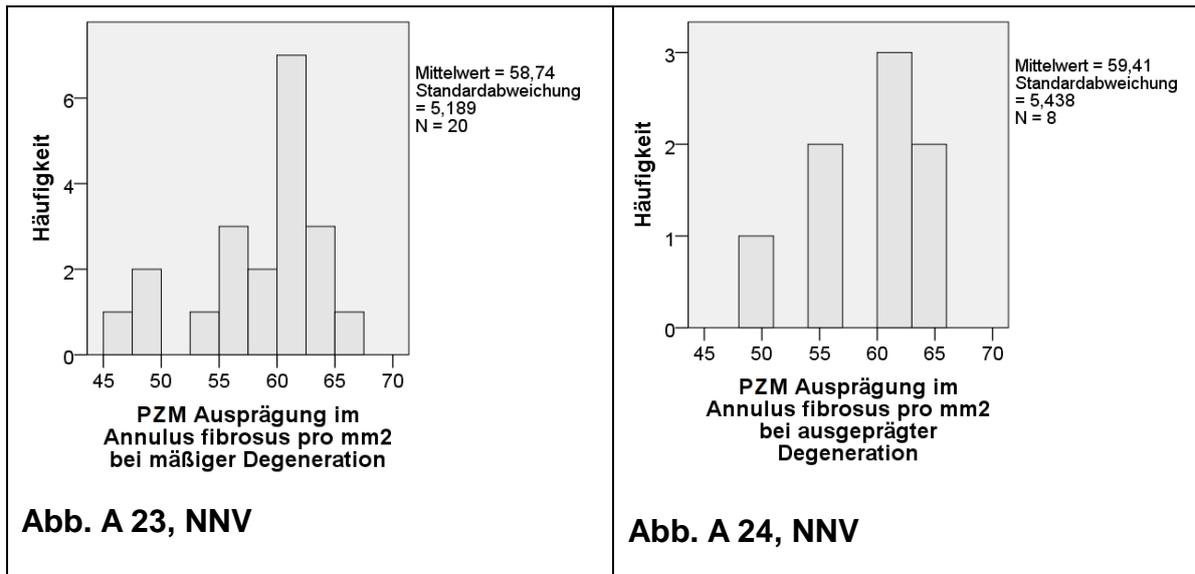


Abb. A 1 – A 24: Die Histogramme zeigen die jeweilige Verteilung der Daten. Anhand der graphischen Darstellung erfolgte eine Einstufung in Normalverteilung (= NV) bzw. nicht Normalverteilung (= NNV) der jeweils getesteten Parameter, zusätzlich angegeben ist jeweils die Standardabweichung.

Die Tabellen A 1 – A 6 zeigen jeweils die p-Werte des Kruskal-Wallis-Test mit * und die der post-hoc-Analyse mittels Mann-Whitney-U mit **. Unterschieden wurde zwischen dem gesamten getesteten Gewebe g , nur den unbelasteten Gewebeproben ub , und den belasteten Gewebeproben b . BSV = Bandscheibenvorfall; PZM = perizelluläre Matrix. Signifikante Werte wurden fett markiert.

Tabelle A 1: Musterverteilung im unterschiedlich degenerierten Gewebe

	Traumagewebe	akuter BSV	chron. BSV	mäßige Degeneration	ausgeprägte Degeneration
Traumagewebe		$p_g = 0,098^{**}$ $p_{ub} = 0,171^{**}$ $p_b = 0,037^{**}$	$p_g < 0,001^{**}$ $p_{ub} = 0,003^{**}$ $p_b < 0,001^{**}$	$p_g < 0,001^{**}$ $p_{ub} < 0,001^{**}$ $p_b < 0,001^{**}$	$p_g = 0,346^{**}$ $p_{ub} = 0,261^{**}$ $p_b = 0,432^{**}$
akuter BSV	$p_g = 0,098^{**}$ $p_{ub} = 0,171^{**}$ $p_b = 0,037^{**}$		$p_g < 0,001^{**}$ $p_{ub} = 0,250^{**}$ $p_b < 0,001^{**}$	$p_g < 0,001^{**}$ $p_{ub} < 0,001^{**}$ $p = 0,040^{**}$	$p_g = 0,435^{**}$ $p_{ub} = 0,692^{**}$ $p = 0,199^{**}$
chron. BSV	$p_g < 0,001^{**}$ $p_{ub} = 0,003^{**}$ $p_b < 0,001^{**}$	$p_g < 0,001^{**}$ $p_{ub} = 0,250^{**}$ $p_b < 0,001^{**}$		$p_g = 0,284^{**}$ $p_{ub} < 0,001^{**}$ $p_b < 0,001^{**}$	$p_g < 0,001^{**}$ $p_{ub} = 0,046^{**}$ $p_b < 0,001^{**}$
mäßige Degeneration	$p_g < 0,001^{**}$ $p_{ub} < 0,001^{**}$ $p_b < 0,001^{**}$	$p_g < 0,001^{**}$ $p_{ub} < 0,001^{**}$ $p = 0,040^{**}$	$p_g = 0,284^{**}$ $p_{ub} < 0,001^{**}$ $p_b < 0,001^{**}$		$p_g < 0,001^{**}$ $p_{ub} < 0,001^{**}$ $p_b < 0,001^{**}$
ausgeprägte Degeneration	$p_g = 0,346^{**}$ $p_{ub} = 0,261^{**}$ $p_b = 0,432^{**}$	$p_g = 0,435^{**}$ $p_{ub} = 0,692^{**}$ $p = 0,199^{**}$	$p_g < 0,001^{**}$ $p_{ub} = 0,046^{**}$ $p_b < 0,001^{**}$	$p_g < 0,001^{**}$ $p_{ub} < 0,001^{**}$ $p_b = 0,002^{**}$	
Kruskall-Wallis-Test	$p_{g, ub, b} < 0,001^*$				

Tabelle A 1: Getestet wurde jeweils die Verteilung der Zelldichte in allen Zellmustern zwischen den unterschiedlich degenerierten Geweben.

Tabelle A 2: Zelldichte einzelner Zellen in unterschiedlich degeneriertem Gewebe

	Traumagewebe	akuter BSV	chron. BSV	mäßige Degeneration	ausgeprägte Degeneration
Traumagewebe		$p_g = 0,029^{**}$	$p_g = 0,029^{**}$	$p_g = 0,023^{**}$	$p_g = 0,048^{**}$
akuter BSV	$p_g = 0,029^{**}$		$p_g = 1,000^{**}$	$p_g = 0,525^{**}$	$p_g = 0,109^{**}$
chron. BSV	$p_g = 0,029^{**}$	$p_g = 1,000^{**}$		$p_g = 0,388^{**}$	$p_g = 0,109^{**}$
mäßige Degeneration	$p_g = 0,023^{**}$	$p_g = 0,525^{**}$	$p_g = 0,388^{**}$		$p_g = 0,354^{**}$
ausgeprägte Degeneration	$p_g = 0,048^{**}$	$p_g = 0,109^{**}$	$p_g = 0,109^{**}$	$p_g = 0,354^{**}$	
Kruskall-Wallis-Test	$p_g = 0,043^*$ $p_{ub} = 0,275^*$ $p_b = 0,167^*$				

Tabelle A 3: Zelldichte der Paare in unterschiedlich degeneriertem Gewebe

	Traumagewebe	akuter BSV	chron. BSV	mäßige Degeneration	ausgeprägte Degeneration
Traumagewebe		$p_g = 0,057^{**}$	$p_g = 0,029^{**}$	$p_g = 0,023^{**}$	$p_g = 0,028^{**}$
akuter BSV	$p_g = 0,057^{**}$		$p_g = 0,057^{**}$	$p_g = 0,682^{**}$	$p_g = 0,933^{**}$
chron. BSV	$p_g = 0,029^{**}$	$p_g = 0,057^{**}$		$p_g = 0,068^{**}$	$p_g = 0,048^{**}$
mäßige Degeneration	$p_g = 0,023^{**}$	$p_g = 0,682^{**}$	$p_g = 0,068^{**}$		$p_g = 0,823^{**}$
ausgeprägte Degeneration	$p_g = 0,028^{**}$	$p_g = 0,933^{**}$	$p_g = 0,048^{**}$	$p_g = 0,823^{**}$	
Kruskall-Wallis-Test	$p_g = 0,031^*$ $p_{ub} = 0,087^*$ $p_b = 0,169^*$				

Tabelle A 4: Zelldichte strings, double strings, kleine Cluster in unterschiedlich degeneriertem Gewebe

	strings	double strings	kleine Cluster
Traumagewebe	$p_g = 0,084^*$ $p_{ub} = 0,234^*$ $p_b = 0,391^*$	$p_g = 0,490^*$ $p_{ub} = 0,432^*$ $p_b = 0,910^*$	$p_g = 0,106^*$ $p_{ub} = 0,522^*$ $p_b = 0,104^*$
akuter BSV			
chron. BSV			
mäßige Degeneration			
ausgeprägte Degeneration			

Tabelle A 5: Zelldichte mittlerer Cluster in unterschiedlich degeneriertem Gewebe

	Traumagewebe	akuter BSV	chron. BSV	mäßige Degeneration	ausgeprägte Degeneration
Traumagewebe		$p_g = 1,000^{**}$ $p_{ub} = 1,000^{**}$	$p_g = 0,343^{**}$ $p_{ub} = 1,000^{**}$	$p_g = 0,045^{**}$ $p_{ub} = 0,182^{**}$	$p_g = 0,808^{**}$ $p_{ub} = 1,000^{**}$
akuter BSV	$p_g = 1,000^{**}$ $p_{ub} = 1,000^{**}$		$p_g = 0,343^{**}$ $p_{ub} = 1,000^{**}$	$p_g = 0,045^{**}$ $p_{ub} = 0,182^{**}$	$p_g = 0,808^{**}$ $p_{ub} = 1,000^{**}$
chron. BSV	$p_g = 0,343^{**}$ $p_{ub} = 1,000^{**}$	$p_g = 0,343^{**}$ $p_{ub} = 1,000^{**}$		$p_g = 0,627^{**}$ $p_{ub} = 0,182^{**}$	$p_g = 0,283^{**}$ $p_{ub} = 1,000^{**}$
mäßige Degeneration	$p_g = 0,045^{**}$ $p_{ub} = 0,182^{**}$	$p_g = 0,045^{**}$ $p_{ub} = 0,182^{**}$	$p_g = 0,627^{**}$ $p_{ub} = 0,182^{**}$		$p_g = 0,021^{**}$ $p_{ub} = 0,054^{**}$
ausgeprägte Degeneration	$p_g = 0,808^{**}$ $p_{ub} = 1,000^{**}$	$p_g = 0,808^{**}$ $p_{ub} = 1,000^{**}$	$p_g = 0,283^{**}$ $p_{ub} = 1,000^{**}$	$p_g = 0,021^{**}$ $p_{ub} = 0,054^{**}$	
Kruskall-Wallis-Test	$p_g = 0,014^*$ $p_{ub} = 0,047^*$ $p_b = 0,123^*$				

Tabelle A 6: Zelldichte einzelner Zellen in unterschiedlich degeneriertem Gewebe

	große Cluster
Traumagewebe	$p_g = 0,365^*$ $p_{ub} = 0,505^*$ $p_b = 0,910^*$
akuter BSV	
chron. BSV	
mäßige Degeneration	
ausgeprägte Degeneration	

Tabelle A 2 – A 6: Getestet wurde die Zelldichte des Musters einzelner Zellen (A 2), Paare (A 3), strings, double strings und kleiner Cluster (A 4), mittlerer Cluster (A 5) sowie großer Cluster (A 6) in den unterschiedlichen Gewebentypen.

12 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Siegfried Weller Institut der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik in Tübingen / dem orthopädischen Zelllabor des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von PD Dr. med. Bernd Rolauffs durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit PD Dr. med. Bernd Rolauffs und Dr. med. Ulf Hofmann, Assistenzarzt der Orthopädischen Klinik in Tübingen.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder (Elena Reidel und Rosa Riester) von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Anleitung durch Dr. med. Ulf Hofmann durch mich.

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

13 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt PD Dr. med. Bernd Rolauffs für die interessante Themenstellung, Unterstützung und inhaltliche Betreuung.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. med. Ulf Hofmann, für die viele Zeit, die stete Erreichbarkeit, die Mühe und vor allem Geduld. Danke für die vielen Denkanstöße und die schnelle Korrektur.

Ebenso danken möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe der Orthopädie und Unfallchirurgie des Siegfried-Weller-Instituts Tübingen für die freundliche Atmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Elena Reidel für die Einarbeitung und bei Rosa Riester für die vielen technischen Tipps und die stete Hilfsbereitschaft.

Mein Dank gilt auch dem Schlachthof Rottenburg für die Rinder-Gewebespende, sowie den Patienten, die ihr Gewebe zu Forschungszwecken gespendet haben.

Meinen Eltern und meiner Schwester, sowie meinen Großeltern möchte ich für die ständige Unterstützung danken, ohne deren Hilfe Vieles nicht möglich gewesen wäre.

Danke Sebastian, dass du immer für mich da bist und mich auffängst.