

Aus dem Zentrum für Spezielle Chirurgie des Bewegungsapparates
Lehrstuhl für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie (Prof. Dr. med. W. Ertel)
Lehrstuhl für Orthopädie (Prof. Dr. med. U. Weber)

Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin

Inflammatorische Reaktion und Apoptose in humanen
Bandscheiben nach Frakturen der thorakolumbalen Wirbelsäule

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach
Orthopädie

Vorgelegt von der Medizinischen Fakultät der Charité- Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Dr. med. Christoph- Eckhard Heyde
geboren am 07. 08. 1964 in Rostock

Eingereicht: Juni 2006
Dekan: Prof. Dr. med. M. Paul
1. Gutachter: Prof. Dr. med. A. Schulz
2. Gutachter: Prof. Dr. med. P. Eysel

Abkürzungsverzeichnis

Apaf	apoptosis protease-activating factor
APAAP	Alkalische Phosphatase anti-Alkalische Phosphatase Methode
Aqua dest	Destilliertes Wasser
BID	BH3 interacting domain death agonist
BS	Bandscheibe
BWS	Brustwirbelsäule
Caspase	Cystein Aspartat spezifische Protease
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DISC	death inducing signaling pathway
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EtOH	Ethanol
HWS	Halswirbelsäule
ICAM-1	intracellular adhesion molecule-1
IGF	Insulin-growth-factor
IL	Interleukin
LWS	Lendenwirbelsäule
MAC	membrane-attack-complex
MMP	Matrix Metalloproteinase
MRT	Magnetresonanztomographie
RNA	Ribonukleinsäure
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
PLIF	posterior lumbar interbody fusion
RT-PCR	real time- polymerase-chain-reaction
SD	standard deviation
SE	standard error
TIMP	tissue inhibitors of metalloproteinases
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAP	tartrate-resistant acid phosphatase-positive multinucleated
TUNEL	Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling
VEGF	Vascular-endothelial-growth-factor

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Frakturen der thorakolumbalen Wirbelsäule	1
1.2 Epidemiologie	2
1.3 Klassifikation	3
1.4 Biomechanische Grundlagen	5
2. BEHANDLUNGSKONZEPT	6
2.1 Konservative Frakturbehandlung	8
2.2 Operative Frakturbehandlung	10
3. KONTROVERSE DER FRAKTURBEHANDLUNG/ LANGZEITPROBLEME	15
4. ZIEL DES PROJEKTES	17
5. BANDSCHEIBENPROBLEMATIK	19
5.1 Bau und Funktion der Bandscheibe	22
5.2 Alterungsprozesse und Degeneration der Bandscheibe	27
5.2.1 Entzündungsreaktion/ Immunantwort	30
5.2.2 Komplementaktivierung	33
5.2.3 Programmierter Zelltod/ Apoptose	35
5.2.4 Mechanische Belastung und Degeneration	40
5.2.5 Trauma und Degeneration	43

6. ARBEITSHYPOTHESE	46
6.1 Spezifische Schritte zur Analyse der Veränderungen in Bandscheiben der thorakolumbalen Wirbelsäule nach Trauma	46
6.1.1 Analyse des zu untersuchenden Gewebes	46
6.1.2 Analyse des Musters der lokalen posttraumatischen Entzündungsreaktion	46
6.1.3 Messung des programmierten Zelltodes/Apoptose der intradiskalen Zellen	47
6.1.4 Analyse der Gen-Expression und der Synthese von zentralen Mediatoren der Apoptose	47
7. MATERIAL UND METHODEN	48
7.1 Patienten	48
7.1.1 Untersuchungsgruppe: Frakturen der thorakolumbalen Wirbelsäule	49
7.1.2 Positive Kontrollgruppe: Bandscheibendegeneration	51
7.1.3 Negative Kontrollgruppe: Gesunde Kontrollbandscheiben	53
7.2 Ethikvotum und Aufklärung	54
7.3 Probengewinnung- und verarbeitung	55
7.3.1 Kryoschnitte	55
7.3.2 Paraffinschnitte	55
7.4 Gewebetypisierung	56
7.4.1 Hämatoxylin- und Hämatoxylin-Eosin-Färbung	56
7.4.2 Färbung nach Masson-Goldner	57
7.4.3 Immunhistochemische Kollagentypisierung	58
7.5 Analyse der posttraumatischen Entzündungsreaktion	59

7.5.1	Immunhistochemische Färbung der Kryoschnitte	61
7.5.2	Immunhistochemische Färbung der Paraffinschnitte	62
7.6	Analyse der Apoptose	63
7.6.1	Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling (TUNEL) und DAPI- Gegenfärbung	63
7.6.2	Flourometrische Bestimmung der Caspaseaktivität	65
7.6.3	Real time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) zur Bestimmung pro- und antiapoptotischer Mediatoren	67
7.6.4	Immunhistochemische Färbung apoptoserelevanter Proteine	68
7.7	Daten- Analyse	68
8.	ERGEBNISSE	69
8.1	Gewebedifferenzierung	69
8.1.1	Hämatoxylin-Färbung	69
8.1.2	Färbung nach Masson-Goldner	70
8.1.3	Immunhistochemische Färbung auf Kollagen-I und Kollagen-II	71
8.2	Posttraumatische Entzündungsreaktion	74
8.2.1	Entzündungszellen	74
8.2.2	Komplementaktivierung	81
8.3	Apoptose in traumatisierten Bandscheiben	86
8.3.1	Nachweis apoptotischer Zellen	86
8.3.2	Analyse der Caspase 3/7, Caspase 8 und Caspase 9 Aktivität	90
8.3.3	Genexpression von pro- apoptotischen Mediatoren	93

8.3.4	Immunhistochemische Färbung apoptoserelevanter Proteine	99
9.	DISKUSSION	103
10.	ZUSAMMENFASSUNG	114
11.	LITERATUR	116
12.	DANKSAGUNG	134
13.	ERKLÄRUNG ENTSPRECHEND ANLAGE 2 DER HABILITATIONSORDNUNG	136
14.	ANHANG	137

1. Einleitung

1.1 Frakturen der thorakolumbalen Wirbelsäule

Traumatisch bedingte Frakturen der thorakolumbalen Wirbelsäule führen zu einer Vielzahl von Verletzungsmustern unter wechselnder Beteiligung der ventralen und dorsalen knöchernen Wirbelanteile, der Bandscheibe sowie der ligamentären, kapsulären und muskulären Weichteilstrukturen. Abhängig vom Ausmaß der Verletzung kommt es zu einer Störung der Integrität der anatomischen Strukturen mit dem Verlust der natürlichen Funktionen der Wirbelsäule. Diese besteht in der Gewährleistung der statischen und dynamischen Funktion des zentralen Achsorgans Wirbelsäule zusammen mit der Protektion der von der Wirbelsäule umschlossenen neuralen Strukturen. Das Ziel der Behandlung von Verletzungen der Wirbelsäule besteht somit in der dauerhaften und schmerzfreien Wiederherstellung ihrer statischen, dynamischen und protektiven Funktion [41]. Die therapeutische Vorgehensweise richtet sich nach einer Reihe von Kriterien, wie dem Grad der Instabilität, der resultierenden Fehlstellung und dem Vorliegen neurologischer Defizite [112]. Obwohl diese Kriterien als Entscheidungshilfen hinsichtlich der therapeutischen Vorgehensweise allgemein etabliert sind, existieren bei einigen Frakturtypen, wie z.B. dem Berstungsbruch, nach wie vor eine Reihe unterschiedlicher Empfehlungen zur Behandlung dieser Frakturen [30]. Es liegen kontroverse Empfehlungen hinsichtlich der Vorgehensweise konservativ versus operativ vor [7,41,79,213]. Weiterhin werden auch bei einer Entscheidung zur Operation hinsichtlich der operativen Vorgehensweise differente Empfehlungen gegeben [54,71,117,167,184,193,223]. Mittel- und langfristige Verlaufskontrollen nach konservativer und operativer Frakturbehandlung haben die wichtige Rolle der mitverletzten nichtknöchernen Strukturen in bezug auf das Langzeitergebnis gezeigt [203]. Hier sind vor allem die an den frakturierten Wirbelkörper angrenzenden Bandscheiben in den Focus des Interesses gerückt. Einer Reihe von im Langzeitverlauf auftretenden Problemen, wie einem konsekutiven Korrekturverlust mit daraus resultierende Sekundärpathologien (z.B. im Verlauf auftretenden Stenosisierungen), liegen offensichtlich Veränderungen im

Bereich der angrenzenden Bandscheibe zu Grunde, die ihre Ursache im initialen Trauma haben [52,157]. Als Ursache werden sowohl die Impaktion der Bandscheibe in den angrenzenden frakturierten Wirbelkörper [157] als auch traumainduzierte intradiskale Veränderungen, die zu einer Beschleunigung der Degeneration der Bandscheibe führen können [52,128], angeführt.

1.2 Epidemiologie

In Deutschland ist pro Jahr mit ca. 10.000 schwerwiegenden Wirbelsäulenverletzungen (Frakturen, Luxationen) zu rechnen, 8000 davon betreffen die thorakolumbale Wirbelsäule [30]. In den Vereinigten Staaten werden pro Jahr ca. 50.000 Wirbelsäulenverletzungen, einschließlich der Halswirbelsäule, registriert [206]. Mehr als die Hälfte der Verletzungen der thorakolumbalen Wirbelsäule ist im thorakolumbalen Übergang (Th11 bis L2) lokalisiert. Der 1. Lendenwirbel und damit das Segment Th12/L1 sind am häufigsten betroffen [30]. Nachfolgend in der Häufigkeit sind der 12. Brust- und der 2. Lendenwirbel betroffen [111,112]. Die hohe Anfälligkeit des thorakolumbalen Überganges resultiert aus dem Übergang von der relativ fixierten Kyphose der Brustwirbelsäule in die frei schwingende Lordose der Lendenwirbelsäule. In ca. 1/5 der Fälle ist mit inkompletten oder kompletten neurologischen Läsionen zu rechnen [111]. Männer sind mit über 60% deutlich häufiger betroffen als Frauen, der Altersgipfel bei diesen Verletzungen liegt zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr.

Die häufigsten Ursachen im europäischen Raum sind Stürze aus großer Höhe und Verkehrsunfälle, gefolgt von Sport- und Freizeitverletzungen, während in anderen Regionen, wie den Vereinigten Staaten oder Südafrika, penetrierende Verletzungen eine nicht unwesentliche Rolle spielen [83,111,185,213].

1.3 Klassifikation

Die Frakturen der thorakolumbalen Wirbelsäule werden entsprechend den Empfehlungen von Magerl et al. [138] klassifiziert. Diese Klassifikation beruht auf dem biomechanischen Zweisäulenkonzept nach Whitesides [216]. Dieses untergliedert die Wirbelsäule entsprechend ihrer natürlichen biomechanischen Belastung in zwei Säulen; eine ventrale lasttragende Säule, bestehend aus dem Wirbelkörper und der Bandscheibe, und eine dorsale, auf Zug beanspruchte Säule, bestehend aus den Wirbelgelenken und dem ligamentären Komplex.

Die Klassifikation nach Magerl et al. [138] berücksichtigt damit sowohl die natürlichen biomechanischen Gegebenheiten der Wirbelsäule als auch die beim Trauma auf die Wirbelsäule einwirkenden Kräfte, welche sich in den drei Hauptgruppen der Frakturen wiederfinden [30,116].

Im Detail erfolgt eine Untergliederung in drei Hauptgruppen von Frakturen.

Typ A- Verletzungen sind Verletzungen der ventralen Säule, welche vorwiegend durch Kompression hervorgerufen werden.

Typ B- Verletzungen sind kombinierte Verletzungen der vorderen und hinteren Säule, welche mit einer Distraktionskomponente verbunden sind.

Typ C- Verletzungen liegen dann vor, wenn zusätzlich zu den vorgenannten Verletzungsmustern eine Rotationskomponente besteht.

Diese drei Hauptgruppen werden entsprechend dem speziellen Verletzungsmuster, vor allem resultierend aus unterschiedlichen Verletzungsmechanismen, in Subgruppen unterteilt, die für eine differenzierte therapeutische Vorgehensweise und prognostisch von Bedeutung sind [194].

Grundsätzlich gilt, dass der Grad der Instabilität der Verletzung von Typ A nach Typ C zunimmt und damit das Risiko einer neurologischen Komplikation von Typ A nach Typ C ansteigt (**Abb. 1**).

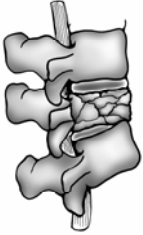
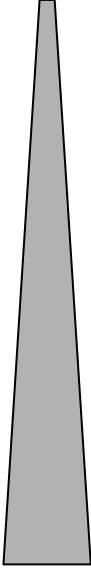
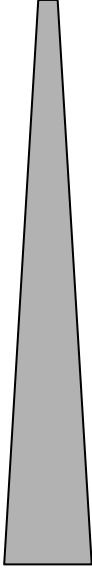
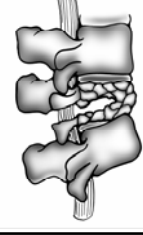

Typ A Kompressions- verletzung		A1 Wirbelkörper- impaktion A2 Spaltbruch A3 Berstungsbruch	Grad der Instabilität 	Neurologische Defizite 
Typ B Distraktions- verletzung		B1 mit Flektion, ligamentär B2 mit Flektion, knöchern B3 mit Extension		
Typ C Rotations- verletzung		C1 mit Kompression C2 mit Distraktion C3 mit Scherung		

Abbildung 1: Klassifikation der Verletzungen der thorakolumbalen Wirbelsäule nach Magerl et al. [138].

1.4 Biomechanische Grundlagen

Die thorakolumbale Wirbelsäule stellt ein komplexes biomechanisches Funktionssystem dar. Die Kenntnis seiner Funktionsweise stellt die unabdingbare Voraussetzung für das Verständnis der vorliegenden Pathologie und die daraus resultierenden therapeutischen Notwendigkeiten dar. Die Belastungen an der thorakolumbalen Wirbelsäule werden nach dem „load-sharing“-Prinzip balanciert. Da der Körperschwerpunkt vor der Wirbelsäule liegt, werden bei einer intakten Wirbelsäule die ventralen Strukturen vor allem auf Kompression „weight-bearing“ beansprucht. Die dorsalen Strukturen werden auf Zug „tension band“ beansprucht. Dabei werden annähernd 80% der axial einwirkenden Kraft als Kompressionskraft von der ventralen Säule absorbiert, während 20% der Last von den dorsalen, auf Zug beanspruchten Strukturen abgefangen werden [80,216] (**Abb. 2 und 3**). Von James et al. [92] konnte nachgewiesen werden, dass die Stabilität eines Wirbelsegmentes gegen Flexion zu etwa 60% von der Intaktheit der ventralen Säule abhängig ist. Durch den Aufbau aus passiven (Knochen, Gelenke, Ligamente) und aktiven (Muskeln) Strukturen und der Wirkungsweise des vorbeschriebenen load sharing- Prinzips ist die Wirbelsäule in der Lage, neben der Aufnahme von Kompressions- und Zugkräften auch Scher- und Torsionskräfte abzufangen [80,124].

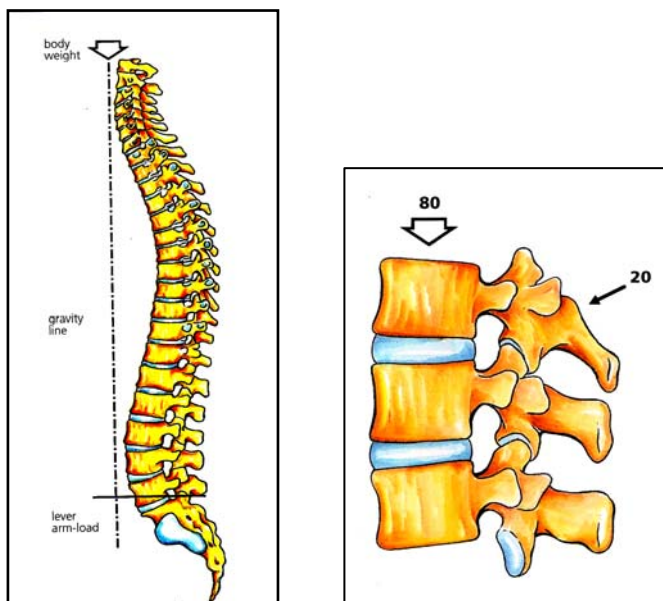


Abbildung 2 und 3: Abbildung 2 links zeigt schematisch den Verlauf der Körperschwerpunktlinie, Abbildung 3 rechts zeigt die Kraftverteilung bei axialer Lastenwirkung an der Wirbelsäule (aus: [80]).

2. Behandlungskonzept

Grundsätzlich ist hierbei zwischen der konservativen und der operativen Therapie zu unterscheiden. Die Indikation zum operativen Vorgehen orientiert sich im Wesentlichen am Grad der durch das Trauma verursachten Fehlstellung, an der resultierenden Instabilität und an der Frage, ob ein neurologisches Defizit vorliegt [23,30].

Für die Instabilität sind Kriterien definiert worden. Generell liegt eine Instabilität dann vor, wenn die Wirbelsäule nicht mehr in der Lage ist, ihre normalen strukturellen Verhältnisse unter physiologischer Belastung aufrecht zu erhalten [163]. Als weitere Kriterien werden die Risiken der unmittelbaren Ausbildung neurologischer Defizite und der Ausbildung sekundärer Instabilitäten und persistierender Schmerzen angegeben [145]. Eine für die tägliche Praxis gut nutzbare Klassifikation wurde von Blauth et al. [23] vorgeschlagen:

- Stabil ist eine Verletzung, wenn keine weitere Veränderung der Stellung der Wirbelsäule in Ruhe oder bei Belastung zu erwarten ist.
- Geringgradig instabil sind Verletzungen, die bei funktioneller Behandlung ohne schwerwiegende Fehlstellung und zusätzliche neurologische Störung ausheilen.
- Hochgradig instabil bedeutet, dass bei funktioneller Behandlung schwere Fehlstellungen und neurologische Komplikationen erwartet werden können.

Einige Autoren [145,185] geben ein primäres neurologisches Defizit, eine sagittale Angulation von $> 25^\circ$ relativ zum Nachbarsegment, einen Höhenverlust des Wirbelkörpers von $> 50\%$ und serielle Frakturen als Instabilitätskriterien an.

Unabhängig vom gewählten Behandlungskonzept sind die Ziele der Therapie gleich. Sie bestehen in einer Wiederherstellung der regelrechten Form der Wirbelsäule, diese muss für die Dauer der Heilung sicher fixiert sein. Um das Ergebnis dauerhaft zu sichern, ist eine knöcherne Ausheilung zu fordern. In dieser ausgeheilten Form

muss die Wirbelsäule ihrer statischen und dynamischen Funktion möglichst schmerzfrei gerecht werden können. Neurologische Defizite müssen vermieden und vorliegenden neurologische Defizite sollten nicht verschlechtert, idealerweise gebessert werden [30,42].

Für die Entscheidung zur Vorgehensweise werden neben den oben angeführten Kriterien das Patientenalter, vorliegende Komorbiditäten, der Habitus und das Vorliegen osteoporotisch bedingter knöcherner Veränderungen sowie Begleitverletzungen herangezogen [185].

Randomisierte prospektive Studien zur Evaluation der unterschiedlichen Therapieverfahren fehlen. Es gibt mehrere systematische Reviews, die sich mit der Wertigkeit der konservativen und der unterschiedlichen operativen Therapieverfahren vergleichend auseinandersetzen. Van der Roer et al. [207] können keine Evidenz bezüglich eines Vorteils konservativer oder operativer Verfahren bei Berstungsfrakturen des thorakolumbalen Überganges aufzeigen, sie zitieren aber eine Reihe von Arbeiten, die bessere Ergebnisse nach operativer Frakturversorgung zeigen. Verlaan et al. [208] zeigen, dass Evidenz basierte Kriterien bezüglich der Art des operativen Vorgehens bei Frakturen der thorakolumbalen Wirbelsäule fehlen, existierende Daten basieren im Wesentlichen auf retrospektiven Fallserien. Alle angeführten Studien zeigen, dass keine operative Methode in der Lage ist, den zu Behandlungsbeginn initial erzielten Repositionsgewinn im Verlauf komplett zu halten.

2.1 Konservative Frakturbehandlung

Historisch beruht die konservative Frakturbehandlung der Wirbelsäule auf zwei unterschiedlichen Konzepten, der konservativen Therapie nach Böhler [24,25] und der frühfunktionellen konservativen Therapie nach Magnus [139,140].

2.1.1 Konservative Therapie nach Böhler

Böhler [24,25] übertrug mit dem Grundsatz: "Einrichten, Ruhigstellen und Üben" das Grundprinzip der Knochenbruchbehandlung der Extremitäten auch auf die Wirbelsäule. Fehlstellungen wurden im Durchhang eingerichtet, dann für drei bis fünf Monate im Gips fixiert, anschließend wurden die Patienten schnellstmöglich mobilisiert und beübt. Daniaux et al. [42] zeigen, dass es nach primär guten Repositionsergebnissen in etwa 25% der Fälle zu einem teilweisen und in weiteren 25% der Fälle zu einem kompletten Repositionsverlust kommt. Eine Korrelation zwischen dem Grad der Fehlstellung und geklagten Beschwerden konnte nicht beobachtet werden. Ab einer Kyphose von 20° ist allerdings mit einer Häufung von Beschwerden und einer reduzierten Arbeitsfähigkeit zu rechnen [204]. Resch et al. [171], Steindl und Schuh [192] und Reinhold et al. [170] berichten im Verlauf über einen kompletten Korrekturverlust bei in dieser Technik behandelten Frakturen. Diese Korrekturverluste kommen zum kleineren Teil durch eine Rekyphosierung im Bereich des verletzten Wirbelkörpers selbst, zum überwiegenden Teil durch Veränderungen im Bereich der angrenzenden Bandscheibe zustande [171]. In den angeführten Arbeiten konnte keine Korrelation zwischen dem Grad der Kyphose und der Patientenzufriedenheit hergestellt werden. Die Autoren gaben aber an, dass der Nachuntersuchungszeitpunkt mit durchschnittlich fünf Jahren für die typischen Spätprobleme zu kurz sein könnte. Steindl und Schuh [192] beobachteten in ca. 1/5 der Fälle eine spontane Blockwirbelbildung mit dem kranial angrenzenden Wirbel, ohne dass diese Beobachtung einen Einfluss auf das subjektive Ergebnis hatte.

2.1.2 Frühfunktionelle Therapie nach Magnus

Die frühfunktionelle Therapie nach Magnus [139,140] berücksichtigt die bestehende Fehlstellung nicht. Vielmehr wird die frakturbedingte Eintauchung des spongiösen Wirbelkörpers als vorteilhaft für die Heilung interpretiert.

Hier erfolgt ohne Reposition, nach einer bis zu sechs Wochen dauernden Ruhigstellung durch Bettruhe, eine schrittweise Mobilisation über den Vierfüßerstand bis zur Vollmobilisation mit einer Dreipunktorthese. Einer drei- bis vier Monate dauernden stabilisierenden Physiotherapie folgt nach gesicherter Frakturkonsolidierung der Übergang zu mobilisierenden Übungen.

Die Ergebnisse zeigen in bis zu 40% der Fälle eine zusätzliche Kyphose von bis zu 10° im Vergleich zur Ausgangslage, in der Literatur finden sich in 80-90% der Fälle gute bis befriedigende subjektive Ergebnisse [42,104,126,186].

Heute wird vorwiegend bei denen nach Blauth et al. [23] als stabil oder geringgradig instabil klassifizierten Verletzungen die funktionelle Therapie durchgeführt [30]. Einer kurzen Immobilisierung im Sinne einer initialen Schmerztherapie folgen die schnelle achsgerechte Mobilisierung und das Anlernen wirbelsäulengerechten Verhaltens. Eine kurzfristige radiologische Kontrolle der Stellung des Wirbelkörpers unter Belastung ist obligat.

2.2 Operative Frakturbehandlung

Die Ziele der operativen Frakturbehandlung bestehen in der Reposition der Fehlstellung, der Retention der reponierten Stellung, der, wenn erforderlich, Dekompression des Spinalkanals und der Durchführung einer knöchernen Fusion für die dauerhafte Sicherung des Ergebnisses, der Spondylodese (**Abb. 4**). Auf diesem Weg kann eine schnelle Mobilisierung und Rehabilitation der Patienten mit einer Verkürzung der Krankenhausverweildauer erreicht werden, und es wird denen durch eine Fehlstellung bedingten Spät komplikationen entgegen gewirkt [22,129].

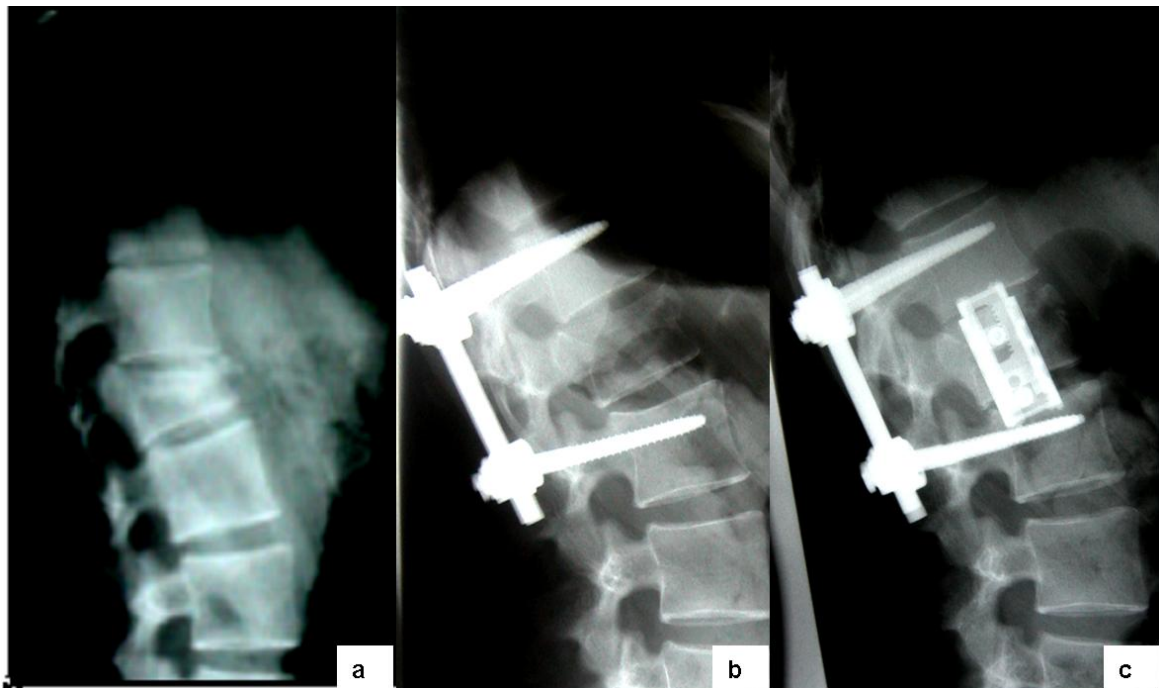


Abbildung 4: **a)** Fraktur des 1. Lendenwirbelkörpers Typ A 3.1 (inkompletter Berstungsbruch) mit Höhenminderung, deutlicher Kyphosierung im Segment und Hinterkantenbeteiligung; **b)** Z.n. Reposition und operativer Stabilisierung des Ergebnisses von dorsal mit Fixateur interne Th12 bis L2, **c)** Z.n. ventraler partieller Korporektomie L1 mit Entfernung der angrenzenden Bandscheiben und Spondylodese mit X-tenz- Cage als Wirbelkörpersatz und Spongiosatransplantation.

Die Wirbelsäule kann sowohl über dorsale als auch über ventrale Zugangswege erreicht werden. Für die operative Versorgung werden, abhängig vom Verletzungsmuster und von den Präferenzen des Operateurs, rein dorsale, rein ventrale und kombinierte Vorgehensweisen empfohlen.

Bei allen angewendeten Techniken ist zu betonen, dass der Focus der Bemühungen auf das Erreichen eines sicheren Langzeitergebnisses zu richten ist. Dieses wird in aller Regel durch die Spondylodese und damit eine dauerhafte Fusion zu erreichen sein. „Although implants provide for immediate stability, they will be only a temporary measure unless simultaneous autologous bone grafting is performed to create the conditions for a biologic and therefore permanent union and stable bone healing“ [41]

2.2.1 Dorsale Frakturversorgung

Bei der Versorgung von dorsal werden heute in der Regel transpedikuläre Schrauben eingesetzt, welche die Einleitung größerer Kräfte, vor allem für die erforderliche Reposition, zulassen und kurzstreckige Versorgungen ermöglichen [11]. Der dorsale Zugang erlaubt eine einfache direkte Reposition und eine effektive Dekompression entweder indirekt durch die Ligamentotaxis bei Reposition oder direkt durch die operative Entlastung des Spinalkanals.

Biomechanisch kommt es bei rein dorsalen Instrumentierungen zu einer Umkehr des Kraftflusses von der ventralen Wirbelsäule auf die dorsalen Abschnitte und damit auf das Implantat. Bis zu 90% der eingeleiteten Kraft werden so dorsal aufgefangen [144]. Allerdings konnte von Cripton et al. [38] gezeigt werden, dass eine rein dorsale Instrumentation bei monosegmentalen Anwendungen den Druck in der von der Instrumentation überbrückten Bandscheibe nur um 50% reduzieren kann.

Eine Sonderform der dorsalen Versorgung stellt die zur dorsalen Instrumentation additiv durchzuführende transpedikuläre Spongiosaplastik dar [39,40]. Das Ziel dieser Maßnahme ist eine Stabilisierung des reponierten Wirbels durch die

Spongiosaauffüllung des durch die Fraktur entstandenen Defektes.

Das Konzept wurde erweitert und kombiniert mit einer partiellen Bandscheibenresektion und nachfolgenden Spongiosaauffüllung des so entstandenen Defektes mit dem Ziel, eine intersomatische Fusion zu erreichen [41]. Mit beiden Verfahren konnte im Verlauf der Korrekturverlust jedoch nicht wesentlich beeinflusst werden, ein Einbau der so eingebrachten Spongiosa war in einem Großteil der Fälle im Verlauf nicht nachweisbar [9,111,114,187].

2.2.2 Ventrale Frakturversorgung

Die isolierte ventrale Frakturversorgung ist vor allem bei Verletzungen mit intakter hinterer Säule und damit bei Typ A-Verletzungen möglich. Ventrale Vorgehensweisen erlauben eine direkte Dekompression des Spinalkanals am Ort der Einengung und eine effektive Wiederherstellung der lasttragenden ventralen Säule. Moderne winkelstabile ventrale Implantatsysteme sind in ihrer Steifigkeit mit dorsalen transpedikulären Systemen vergleichbar [184,223].

Vertreter dieser Vorgehensweise betonen die aus ihrer Sicht besser mögliche Dekompression des Spinalkanals von ventral und den Vorteil, auf einen zusätzlichen dorsalen Zugang verzichten zu können [47,117,181].

Die Angaben zu dem postoperativ auftretenden Korrekturverlust variieren zwischen 5° bis 15°. Problematisch zeigt sich hier im Vorfeld die sichere Abgrenzung reiner Typ A- Verletzungen zu okkulten Typ B- Verletzungen, was durch die dann gestörte dorsale Zuggurtung einen progredienten postoperativen Korrekturverlust erklären könnte [52,72].

2.2.3 Kombinierte Frakturversorgung

Eine kombinierte ein- oder zweizeitige Vorgehensweise unter Nutzung sowohl des dorsalen als auch des ventralen Zugangs wird zunehmend praktiziert. Entsprechend den biomechanischen Gegebenheiten der gesunden Wirbelsäule scheint sich die

kombinierte Vorgehensweise für rekonstruktive Maßnahmen als am günstigsten zu erweisen, da damit die eingeleiteten Kräfte in Anlehnung an das „load-sharing“-Prinzip optimal balanciert werden können [215]. Es können sowohl die dorsale, auf Zuggurtung beanspruchte Säule, als auch die ventrale lastaufnehmende Säule rekonstruiert werden. Die gezielte kurzstreckige dorsoventrale Fusion erlaubt eine schnelle Mobilisierung und eine orthesenfreie Nachbehandlung [52,113].

Die kurzstreckige Versorgung ist unter anderem auch bezüglich der bekannten Problematik der Dekompensation des Nachbarsegmentes, im Anschluss an versteifende Verfahren, von Bedeutung. Neben der Rebalancierung des Profils hat auch die Ausdehnung der Fusionsstrecke einen Einfluss auf die zu erwartende Dekompensationsrate der Nachbarsegmente [35,48,180].

Nach kombinierter Versorgung werden Fusionsraten von bis zu 97% beschrieben [60]. Der Korrekturverlust nach einer kombinierten Frakturversorgung ist im Vergleich der verschiedenen Vorgehensweisen am geringsten [19,54,71,167,193]. Einige Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass im Vergleich zu nur von dorsal operierten Patienten bei dieser Vorgehensweise, neben einem geringeren Korrekturverlust, auch die subjektive Patientenzufriedenheit am höchsten war [71,181].

2.2.4 Temporäre Instrumentation (Segmenterhaltend)

Der zunehmende Einsatz der MRT in der Frakturdiagnostik hat zu einer besseren Beurteilbarkeit der involvierten diskoligamentären Weichteilstrukturen geführt. Wenn die MRT keine morphologische Diskusverletzung zeigt, so wird von verschiedenen Autoren bei Typ A- und z.T. auch bei Typ B1- Frakturen nach Magerl et al. [138] nach Reposition lediglich eine dorsale Instrumentation durchgeführt. Diese hat das Ziel, den verletzten Bereich bis zur Ausheilung in der anatomisch regelrechten Stellung zu fixieren, ausgehend von der Annahme einer intakten Bandscheibe. Eine nach der Metallentfernung durchzuführende MRT-Kontrolle entscheidet, ob bei weiter unauffälliger Bandscheibe zusätzliche Maßnahmen unterbleiben können oder ob bei morphologischen bzw. biochemischen intradiscalen Veränderungen eine additive ventrale Spondylodese notwendig wird.

Die dazu vorgestellten Studien zeigen gute ein bis drei Jahresergebnisse bezüglich einer Reduktion der additiven ventralen Eingriffe [57,175].

Ob die kernspintomographischen Signalmuster wirklich Rückschlüsse auf die biochemischen Prozesse und damit auf die biomechanischen Eigenschaften der Bandscheibe zulassen, muss im Langzeitverlauf noch erwiesen werden [52].

3. Kontroversen der Frakturbehandlung/ Langzeitprobleme

Besonders die Versorgung der unter Typ A3 nach Magerl et al. [138] zusammengefassten Frakturen wird kontrovers diskutiert. Resch et al. [171] sehen bei diesen Frakturen auf Grund der Beteiligung der Hinterkante eine Übergangsform zwischen stabil und instabil. Wegen der Beteiligung der Hinterkante müssen diese Frakturen zumindest gegenüber axialen Kompressionskräften als nicht stabil angesehen werden [170]. Andere Autoren sehen die Instabilitätskriterien nicht klar definiert, der Grad der Kyphose, der Grad der Einengung des Spinalkanals und die Höhenminderung sind speziell bei diesen Frakturtypen weiter in der Diskussion, lediglich ein neurologisches Defizit wird allgemein als Instabilitätskriterium akzeptiert [7]. Für diese Frakturtypen werden damit sowohl Empfehlungen zur konservativen Therapie mit guten Langzeitergebnissen [7,213] als auch zur operativen Versorgung gegeben [43,193]. Von verschiedenen Autoren wird der Korrekturverlust nach konservativer Therapie als signifikant höher angegeben als nach operativer Therapie [171,185].

Ein weiteres zu beachtendes Problem ist der sekundäre Korrekturverlust bei nur von dorsal operativ stabilisierten Frakturen, wobei dieser in bis zu zwei Drittel im Bereich der angrenzenden Bandscheiben stattfindet [52,129,193]. Nach kurz- und mittelfristigen Verläufen wird eine Korrelation des Grades der Kyphose mit bestehenden Beschwerden in aller Regel nicht hergestellt. Residuelle Kyphosen führen ab einer bestimmten Größenordnung jedoch zu einer signifikanten Zunahme der Beschwerden und Einschränkung der Aktivität im Langzeitverlauf. Von einer Reihe von Autoren wird dies ab einer persistierenden posttraumatischen Kyphose von $\geq 20^\circ$ im Vergleich zu Kyphosen von $< 20^\circ$ beobachtet. [59,103,204,216]. Andere Autoren sehen diese Zusammenhänge bei residuellen Kyphosen von $\geq 30^\circ$ [141,206]. Diese Beschwerden treten in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle erst im Langzeitverlauf nach mehr als 10 Jahren auf, da bis zu diesem Zeitpunkt Kompensationsmechanismen die Probleme überdecken können [194,204]. Bei Kyphosen dieser Größenordnung werden auch kosmetische Probleme berichtet [206].

Beschwerdeursachen werden in einer kompensatorischen Hyperlordose der an die Kyphose angrenzenden Wirbelsäulenabschnitte gesehen [151]. Daraus resultierende Inkongruenzen der Wirbelgelenke mit konsekutiver Arthrose werden diskutiert [58,193]. Kurzbogige Kyphosen, wie sie gerade nach Frakturen zu beobachten sind, verlagern die Schwerpunktlinie des Körpers nach vorne [26]. Die daraus folgende Überbelastung der unphysiologisch beanspruchten Weichteile, vor allem der dorsalen Bänder und Muskeln, ist eine weitere Ursache chronischer Schmerzen [206]. Eine für den Ausgleich des Gesamtprofils erforderliche verstärkte Beckenkipfung [194] und eine Dekompensation der Nachbarsegmente stellen ebenfalls Ursachen chronischer Beschwerden dar [216]. Eine Reihe von Autoren sehen in der Instabilität der an die Fraktur angrenzenden direkt oder indirekt verletzten Bandscheibe selber die Hauptursache für die im Langzeitverlauf auftretenden Beschwerden [44,51,79,132,187]. Auch diese Veränderungen der Bandscheibe können sekundär zu Inkongruenzen der Wirbelgelenke mit einer konsekutiven Arthrose führen [71]. Neben den subjektiv auftretenden Problemen wie Schmerz und eingeschränkter Leistungsfähigkeit besteht bei einer persistierenden Kyphose die Gefahr der Entstehung sekundärer myelopathischer Veränderungen oder von Syringomyelien mit konsekutiven, häufig spät beginnenden, neurologischen Störungen [44,79,141,216]. Auch bei Patienten mit primären neurologischen Defiziten korreliert die Häufigkeit der Ausbildung einer Syringomyelie neben dem verbliebenen Grad der Einengung des Spinalkanals mit der Ausprägung der persistierenden Kyphose [1].

Whitesides formulierte 1977 [216]: "The presence of a chronic disabling kyphosis means that the therapy in the acute phase has failed".

4. Ziel des Projektes

Es existieren in der Therapie von Verletzungen der Wirbelsäule eine Reihe offener Fragen und kontrovers diskutierter Probleme. Dazu gehören sowohl die Diskussion bezüglich der optimalen operativen Strategie bei der Versorgung instabiler Verletzungen der thorakolumbalen Wirbelsäule als auch das Problem des im Behandlungsverlauf häufig zu beobachtenden Korrekturverlustes. Dieser tritt sowohl nach konservativer Therapie als auch nach operativer Versorgung auf. Obwohl sämtliche operative Verfahren nicht in der Lage sind, das unmittelbar postoperative Ergebnis im Langzeitverlauf komplett zu halten, spielt dieser Gesichtspunkt nach einer rein von dorsal durchgeführten operativen Stabilisierung offensichtlich eine besondere Rolle [52,129,193].

In den Blickpunkt des Interesses sind deshalb die unmittelbar durch das Trauma mitbetroffenen benachbarten Bandscheiben gerückt, da eine Reihe von Arbeiten zeigen konnten, dass der Korrekturverlust im verletzten Segment in bis zu zwei Dritteln des Gesamtkorrekturverlustes in diesen Bandscheiben stattfindet [39,41,51,58,71,103,111,113,127,129,171,187]. Dies scheint vor allem auf posttraumatische intradiskale Veränderungen zurückzuführen zu sein, die letztendlich zu einer verfrühten Degeneration der Bandscheibe führen können [44,51,79,108,132,187].

Aus der Forschung sind eine Reihe intradiskaler Prozesse bekannt, die bei der alters- bzw. überlastungsbedingten Degeneration der nicht traumatisierten Bandscheibe eine Rolle spielen. Hier spielen vor allem verschiedene Entzündungsmechanismen und Apoptose eine zentrale Rolle. Es ist belegt, dass dabei neben genetischen sowohl biochemische als auch mechanische Faktoren eine Rolle spielen [4,6,11,33,67,101,106,178,209].

Aus den gemachten Ausführungen ergibt sich die Frage, inwieweit ein einmaliges und schweres Trauma ebenso zu solchen Veränderungen führen kann, wie sie aus degenerierten Bandscheiben, hervorgerufen durch konsekutive Be- und Überlastungen, bekannt sind.

Das Ziel dieser Arbeit ist damit die Analyse der posttraumatischen biochemischen Prozesse, die in Bandscheiben ablaufen, welche an frakturierte Wirbelkörper angrenzen und die im Rahmen der an unserer Abteilung üblichen Strategie einer dorsoventralen Frakturversorgung während der operativen Versorgung mit entfernt werden müssen.

Untersucht werden die posttraumatischen Entzündungsreaktionen und die Apoptose ortständiger intradiskaler Zellen in Bandscheiben, die an frakturierte Wirbel angrenzen. Dabei werden die Infiltration mit Entzündungszellen und die Freisetzung der gewebeständigen Mediatoren der Komplementkaskade analysiert. Die Apoptose sowie deren Aktivierungswege werden bestimmt. Die Resultate der Bandscheiben aus der Traumagruppe werden mit Ergebnissen aus degenerativ veränderten Bandscheiben und mit gesunden Kontrollbandscheiben verglichen.

Damit soll ein Beitrag zum besseren Verständnis der posttraumatisch intradiskal ablaufenden Prozesse geleistet werden. Das Ziel ist ein besseres Verständnis der zu erwartenden Veränderungen in der geschädigten Bandscheibe im weiteren Verlauf.

Zur Darstellung der für die Bandscheibe bekannten Daten und damit der sich ergebenden Fragestellungen wird im Weiteren die „Bandscheibenproblematik“ detailliert erörtert. Bau und Funktion der Bandscheibe und degenerative und durch Trauma bedingte Bandscheibenveränderungen werden an Hand der zur Verfügung stehenden Literatur analysiert, um die in dieser Arbeit unter Arbeitshypothese aufgeführten Ideen und die unter Material und Methoden aufgeführten Untersuchungsansätze zu begründen und zu untermauern.

5. Bandscheibenproblematik

Nach Lob [132] heilen direkte Verletzungen der Bandscheibe insuffizient und führen im günstigsten Fall zur Bildung einer knöchernen ventralen Spange.

Bei Frakturen der thorakolumbalen Wirbelsäule, ohne direkte Verletzungen der an die Fraktur angrenzenden Bandscheibe, stellt sich der Sachverhalt nicht so klar dar wie bei der von Lob [132] 1954 gemachten und noch heute gültigen Aussage [77].

Thorakolumbale Frakturen, die konservativ in der Technik nach Böhler behandelt wurden und Patienten mit thorakolumbalen Frakturen, die mit einem ausschließlich von dorsal durchgeführtem operativem Verfahren versorgt wurden, zeigen im Langzeitverlauf deutliche Korrekturverluste. Wie schon oben bemerkt, handelt es sich hier um Korrekturverluste, die sich vor allem im Bereich der an die Fraktur angrenzenden Bandscheiben abspielen. Hier werden sekundäre Korrekturverluste zwischen 10° und 15° beschrieben, was bis zu 2/3 des Gesamtkorrekturverlustes des verletzten Segments entspricht [39,41,51,58,71,103,111,127,171,187].

Damit stellt sich die Frage nach der Ursache dieses posttraumatischen Korrekturverlustes in den angrenzenden Bandscheiben und den diesem Prozess zu Grunde liegenden Veränderungen. In der zu diesem Thema vorliegende Literatur finden sich eine Reihe von Theorien, die versuchen, den Repositionsverlust, welcher in den an den frakturierten Wirbel angrenzenden Bandscheiben stattfindet, zu erklären.

Wolter und Kortmann [218] interpretieren die Vorgänge als Folge einer Verletzung der Bandscheibe im Rahmen des initialen Traumas. Die im Rahmen der Reposition durchgeführte Distraction führt zu einer Erweiterung der Bandscheibe, in welcher in der Folge eine Narbe entsteht, die axiale Kräfte nicht gleichmäßig balancieren kann. Daraus resultierte eine potentielle Instabilität, die sich z.B. in Verknöcherungen, besonders im Bereich des vorderen Längsbandes, äußert.

Andere Autoren sehen in der aus den posttraumatisch bedingten degenerativen Veränderungen resultierenden Instabilität der direkt oder indirekt verletzten Bandscheibe die Hauptursache für die im Langzeitverlauf auftretenden Probleme [44,51,54,71,79,132,187].

MRT-Untersuchungen von Bandscheiben, die an frakturierte Wirbelkörper angrenzen zeigten, dass es seltener zu biochemischen als zu strukturellen Veränderungen des Nucleus pulposus kommt und der Anulus fibrosus in der Regel kaum Veränderungen zeigt. Mit zunehmendem Grad der primären morphologischen Schädigung sinkt auch der Anteil biochemisch intakter Bandscheiben. Interessanterweise zeigen diese Untersuchungen die untere, frakturferne Bandscheibe häufiger von biochemischen Veränderungen betroffen als die obere frakturnahe Bandscheibe [175]. Zu Grunde gelegt wurden die Erkenntnisse von Tertti et al. [200], die zeigen konnten, dass mittels der MRT - und hier besonders in der T2-Wichtung - eine Aussage über die biochemische Diskusdegeneration möglich ist. Fürderer et al. [57] zeigen an Hand einer MRT-Untersuchung, dass Frakturen nicht folgerichtig zu Signaländerungen in den angrenzenden Bandscheiben führen müssen, dies eher in der Minderzahl der Fälle zu beobachten ist. Liegen initiale morphologische Veränderungen vor, so ist eine Persistenz oder Progredienz der Veränderungen in der T2- Wichtung häufiger zu beobachten.

Bei Verletzungen, die durch den gesamten Wirbelkörper hindurch gehen, wird vor allem ein in der kaudal gelegenen Bandscheibe intradiskal gelegenes Hämatom für die fehlende Heilungspotenz verantwortlich gemacht [103].

Oner et al. [157] untersuchten an die Fraktur angrenzende Bandscheiben bei konservativ oder von dorsal operativ versorgten Frakturen im Verlauf mit dem MRT. Sie konnten zeigen, dass das Einbrechen der Bandscheibe in den frakturierten Wirbelkörper, das sogenannte „creeping in“, durch die geschädigte Endplatte hindurch die Hauptursache für den konsekutiven Repositionsverlust im Langzeitverlauf war. Da es durch die Reposition nicht zu einer kompletten Wiederherstellung der Endplatte kommt, sondern ein Defekt verbleibt, sinkt die

Bandscheibe im Verlauf in diesen präformierten Hohlraum wieder ein. Obwohl die MRT in einigen Bandscheiben Signaländerungen aufzeigte, die für Degenerationen sprachen, konnte diese Arbeitsgruppe keine konsistenten Veränderungen in den Bandscheiben nachweisen, die für rein biochemische Veränderungen sprechen. Diese These des „creeping in“ wird von den Autoren mit den biomechanisch gewonnen Erkenntnissen von Roaf [172] und Natarjan et al. [149] untermauert, die besagen, dass die Bandscheibe eine wesentlich höhere Festigkeit gegenüber axialer Gewalteinwirkung aufweist als der Wirbelkörper.

Nach Krismer et al. [119,120] und Lu et al. [136] kommt es zu einem intradiskalen Druckverlust durch den Endplatteneinbruch und das dadurch vergrößerte Volumen des Bandscheibenzwischenraumes bei gleichbleibender Oberfläche. Diese unphysiologischen Veränderungen können im Verlauf zu einem akzelerierten Verschleiß führen.

Die Vielzahl der oben aufgezeigten Untersuchungen und die daraus gewonnenen, z.T. differenten Erkenntnisse legen nahe, dass eine weitere Beschäftigung mit den in der potentiell geschädigten Bandscheibe ablaufenden Prozessen sinnvoll erscheint. Nachfolgend sollen dazu die anatomischen und biochemischen Gegebenheiten der gesunden, der alternden und der degenerierten Bandscheibe dargestellt werden.

5.1 Bau und Funktion der Bandscheibe

Jede Bandscheibe muss, zusammen mit den dorsal gelegenen Wirbelgelenken, die gesamte axial auf die Wirbelsäule einwirkende Last auf der Höhe ihrer Lokalisation aufnehmen. Die Bandscheibe bildet zusammen mit den angrenzenden Wirbelkörpern, den Wirbelgelenken und dem ligamentären Komplex eine funktionelle Einheit, das Bewegungssegment nach Junghanns [93] (**Abb.5**).

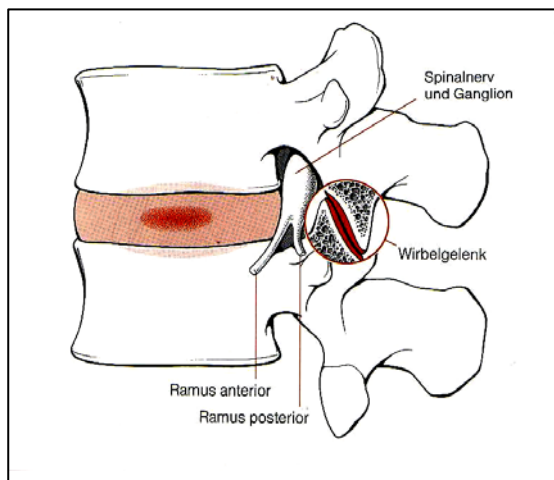


Abbildung 5: Gezeigt wird das Bewegungssegment nach Junghanns [93], eine funktionelle Einheit, die sich aus der Bandscheibe, den angrenzenden Wirbeln mit den Wirbelgelenken und dem ligamentären Komplex zusammensetzt (aus: [152]).

Anatomisch gesehen, handelt es sich bei der Bandscheibe um eine Symphyse [221]. Der typische Aufbau des Discus intervertebralis besteht aus einem äußeren bindegewebigen Faserring, dem Anulus fibrosus, und dem davon umschlossenen Gallertkern, dem Nucleus pulposus. Zu der Funktionseinheit Discus intervertebralis ist die kartilaginäre Endplatte, als Begrenzung und Übergang zum angrenzenden Wirbelkörper, hinzuzurechnen. Der Anulus fibrosus besteht aus 10 bis 15 bindegewebigen Lamellen aus kräftigen Kollagenfasern. Diese Lamellen laufen in Schraubentouren zur Längsachse der Wirbelsäule in einem Winkel von 30° zur Endplatte. In jeweils aufeinander folgenden Schichten ist die Richtung der Lamellen gegenläufig, so dass die Fasern jeweils in einem 120° Winkel zueinander verlaufen

und so ein stabiles Scherengitter bilden. Die mikroskopische Strukturanalyse zeigt eine weitere Untergliederung des Anulus fibrosus. Es werden von außen nach innen ein Faserring aus dicht angeordneten Kollagenfasern, eine fibrocartilaginäre Schicht, in der sich die straffe Anordnung der Kollagenfibrillen lockert und eine so genannte transiente Zone, eine dünne Abgrenzung zum Nucleus pulposus, unterschieden [29,33]. Der Anulus fibrosus ist in seinen oberflächlichen Schichten mit Sharpey-Fasern in den knöchernen Randleisten und in seinen tieferen Schichten im Hyalinknorpel auf den Grund- und Deckplatten der angrenzenden Wirbel verankert [125]. Diese Kollagenfaserhülle umschließt den unter Quelldruck stehenden Nucleus pulposus (**Abb.6**).

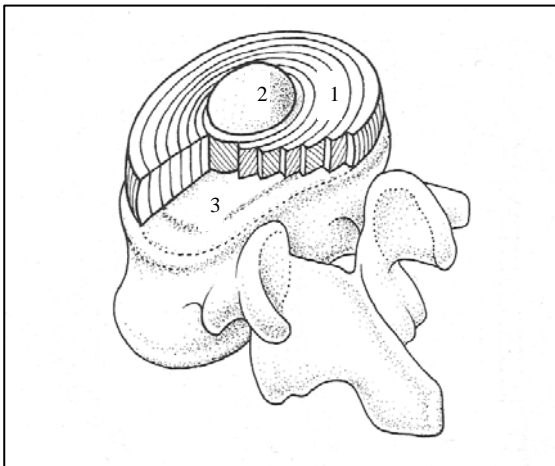


Abbildung 6: Schematischer Aufbau der Bandscheibe aus dem Anulus fibrosus (1), dem Nucleus pulposus (2) und der kartilaginären Endplatte(3); (aus: [152]).

Der Nucleus pulposus besteht aus Matrix-Kollagenen, welche ein Netzwerk bilden, in das Proteoglykane und andere Glycoproteine mit hohen Wasserbindungseigenschaften eingebettet sind. Der Nucleus pulposus einer gesunden Bandscheibe hat einen Wassergehalt von 70% bis 90% [221]. Der Nucleus pulposus besteht im Wesentlichen aus Kollagen Typ II, welches geeignet ist, Druckbelastungen entgegen zu wirken, während der Anulus fibrosus vor allem Kollagen Typ I enthält, das besonders geeignet ist, Scherkräfte abzufangen [49,50]. Weiterhin enthält die Bandscheibe geringe Anteile an Kollagen Typ III, IV, VI und XI,

die vor allem eine Rolle in der Organisation der Fibrillen und damit des Netzwerkes der Matrix spielen [66,82]. Der Trockengewichtanteil der Kollagene beträgt im Anulus fibrosus 70% und im Nucleus pulposus 20%, während das Trockengewicht der Proteoglykane im Anulus fibrosus ca. 20% und im Nucleus pulposus ca. 65% ausmacht [29,50]. Hauptbestandteil der Proteoglykane ist das sogenannte Aggrecan-Proteoglykan [94]. Dieses Molekül bindet über ein Link-Protein an Hyaluronsäure an und bildet damit große Molekül-Komplexe aus. Innerhalb der Proteoglykanpolymere zeichnen sich einige, z.B. die Glykosaminoglykane Chondroitinsulfat und Keratansulfat, durch ihren hohen Anteil an Sulfatgruppen aus. Deren negative Ladungen (Polyanionenstruktur) vermitteln die Festigkeit der Proteoglykane. Vor allem die sulfatierten Gruppen besitzen eine hohe Wasserbindungsfähigkeit [202].

Die Bandscheibe enthält wenige Zellen. Der Anteil beträgt zwischen 1% und 5% des Gesamtvolumens der Bandscheibe [61]. Die Zellzahl nimmt von den Endplatten zum Nucleus pulposus und von Anulus fibrosus zum Nucleus pulposus ab [81]. Die Zellen der Endplatten sind typische Chondrozyten, die Zellen des Nucleus pulposus werden als „Chondrozyten ähnlich“ und die des Anulus fibrosus als „Fibrozyten- und Fibroblasten ähnliche“ Zellen bezeichnet [61]. Während die Fibrozyten- und Fibroblasten ähnlichen Zellen nur in der äußeren Schicht des Anulus fibrosus lokalisiert sind, finden sich die Chondrozyten in allen anderen vorbeschriebenen Anteilen der Bandscheibe [28]. Im Nucleus pulposus werden auch Restzellen der fetalen Chorda beschrieben [221], diese können jedoch nur bis ins frühe Erwachsenenalter nachgewiesen werden [205]. Die Zellen sind in die extrazelluläre Matrix eingebettet, die von ihnen im Sinne eines konstanten „turn over“ produziert und remodelliert wird [29,66,82]. Dabei wird die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix sowohl direkt von den lokalen Zellen als auch durch Mediatoren, wie Zytokinen und Wachstumsfaktoren, kontrolliert [143]. Hier liegt eine fein abgestimmte gegenseitige Beeinflussung der Homöostase vor, da ebenfalls die Matrixproteine über die Stimulierung transmembranöser Rezeptoren sowohl einen Einfluss auf die Syntheseleistung der Zellen als auch auf das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung haben. Die verschiedenen Zelltypen der Bandscheibe unterscheiden sich sowohl hinsichtlich ihrer Syntheseleistung als auch hinsichtlich

ihrer mechanischen Eigenschaften [69]. Die Zellen des Nucleus pulposus und der transienten Zone haben eine höhere Syntheseleistung an Kollagenen und Proteoglykanen als die Zellen des Anulus fibrosus. Hinsichtlich ihrer mechanischen Eigenschaften zeigen die Zellen des Nucleus pulposus eine höhere Steifigkeit und eine signifikant höhere Viskosität als die Zellen des Anulus fibrosus. Die unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften beruhen auf Unterschieden im Bau des Zytoskeletts, vor allem abhängig von der Gesamtmenge und der Verteilung des Moleküls Aktin [69,81].

Die Resistenz der gesunden Bandscheibe gegenüber Zug- und Scherkräften auf der einen und gegenüber axialer Krafteinwirkung auf der anderen Seite sichert sowohl die Mobilität als auch die Widerstandsfähigkeit der Wirbelsäule gegenüber vertikalen Belastungen [55]. Es handelt sich beim Gesunden um ein stabiles viskoelastisches System. Der Nucleus pulposus ist durch seine Wasserbindungseigenschaften in der Lage, der axialen Belastung entgegenzuwirken und diese gleichmäßig zu verteilen. Dies wird durch den Aufbau eines hydrostatischen Druckes in dem durch den Anulus fibrosus und die angrenzenden Endplatten limitierten Raum bei axialer Last ermöglicht. Hierbei werden, abhängig von der Körperhaltung und der ausgeführten Tätigkeit, intradiskale Drücke zwischen 2 Atmosphären (Liegen) und 30 Atmosphären (Heben schwerer Gewichte in gebeugter Körperhaltung) aufgebaut [147]. Der Anulus fibrosus wirkt durch sein alternierend angeordnetes Fasernetzwerk vor allem Zug-, Scher- und Rotationskräften entgegen [120]. Veränderungen in der Architektur des Anulus fibrosus sind mit einem Verlust dieser Eigenschaften vergesellschaftet. So konnten Krömer et al. [121] nachweisen, dass eine durch Fissuren gekennzeichnete Degeneration des Anulus fibrosus mit einer Verminderung der Rotationsstabilität verbunden ist. Auf molekularer Ebene sind diese Eigenschaften an die strukturelle Integrität der extrazellulären Matrix und das physiologische Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Kollagenen, den Proteoglykanen und Glycoproteinen und dem davon anhängigem Wassergehalt gebunden [12].

Nach Krämer [118] verschwinden die Blutgefäße der Bandscheibe mit dem 2. – 4. Lebensjahr, damit wird die sogenannte „Frühphase der Diskose“ eingeleitet. Die weitere Ernährung erfolgt via Diffusion über die kartilaginären Endplatten, die über ein dünnes kapilläres Netzwerk verfügen, zu einem kleinen Teil über Blutgefäße, die das äußere Drittel des Anulus fibrosus versorgen [12]. Diese Blutgefäße verschwinden jedoch mit Beginn der dritten Lebensdekade [174]. Nährstoffe werden somit über die Konvektion von Wasser aus dem umliegenden Bindegewebe und über die angrenzenden Knorpelplatten bereitgestellt [202]. Die äußeren Anulusanteile erhalten ihre Versorgung aus den Blutgefäßen des umgebenden Gewebes, während die inneren Anulusanteile und der Nucleus pulposus im Wesentlichen über die Endplatten versorgt werden [86]. Ein ausreichender Austausch von Wasser und Nährstoffen ist dabei an den Wechsel von Be- und Entlastungsphasen der Bandscheibe gebunden, da tagsüber unter Last die Bandscheibe Volumen verliert und dieses in der Nacht unter Entlastung wieder ausgeglichen wird [56].

Weiterhin sind sowohl die Versorgung der ortständigen Zellen als auch der Abtransport von Stoffwechselprodukten abhängig von der regelrechten Struktur des makromolekularen Netzwerkes der extrazellulären Matrix und deren Wassergehalt, der vorwiegend von der Konzentration der Proteoglykane abhängig ist [29].

5.2 Alterungsprozesse und Degeneration der Bandscheibe

Unter physiologischen Bedingungen kommt es zu Altersveränderungen der Bandscheibe durch Dehydratation, verbunden mit einer zunehmenden Degeneration [12]. Eine Degeneration der Bandscheibe über das normale altersentsprechende Maß hinaus wird in der Regel durch ein Missverhältnis zwischen Belastung und Belastbarkeit, bei Erkrankungen des Stütz- und Bewegungsapparates, nach Verletzungen oder auch in Folge systemischer Erkrankungen hervorgerufen [86,118]. Die Degeneration der Bandscheibe ist charakterisiert durch Dehydratation, Fissurbildung im Anulus fibrosus, Austritt von Anteilen des Nucleus pulposus durch diese Fissuren und durch Veränderungen im Bereich der Endplatten [55,220]. Durch den damit verbundenen Höhenverlust der Bandscheibe kommt es zu Störungen im gesamten Bewegungssegment nach Junghans. Diese Veränderungen beeinflussen nachhaltig die biomechanischen Eigenschaften. Bei der gesunden Bandscheibe wirkt der hydrostatische Druck im Nucleus pulposus der axial einwirkenden Kraft entgegen. Durch den zunehmenden Verlust dieser Eigenschaft des Nucleus pulposus und einer strukturell und durch den verminderten Wassergehalt bedingten gleichzeitigen Verkleinerung seines Volumens sowie durch die degenerativ bedingte Verdickung der Kollagenfasern des Anulus fibrosus wird die axial einwirkende Kraft vermehrt von dessen Fasern aufgefangen [3]. Dies führt zur weiteren Überlastung dieser Strukturen (**Abb.7**).

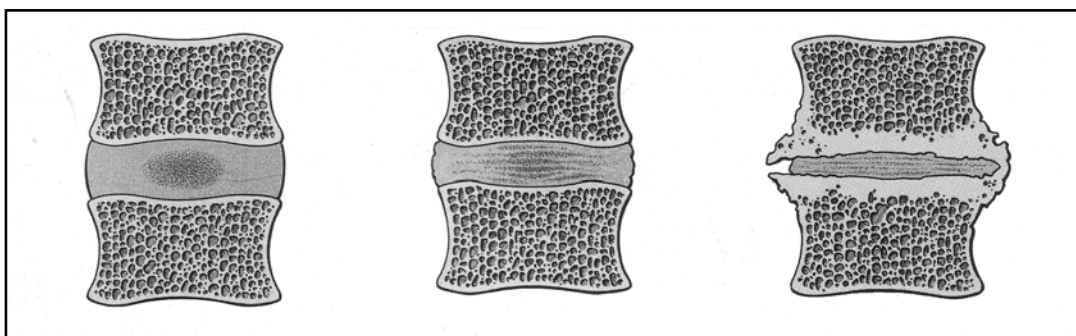


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Höhenminderung der Bandscheibe durch degenerative Prozesse (aus: [152]).

Auf molekularer Ebene ist bei adulten Bandscheiben, im Vergleich zu hyalinem Knorpel, ein vermehrter Abbau von Kollagenfibrillen zu beobachten [85]. Weiterhin beschrieben sind eine vermehrte Spaltung der vernetzenden Proteine, verbunden mit einer verminderten Bindungsfähigkeit der Aggrecan-Proteoglykane, einer Änderung der Zusammensetzung der Proteoglykane und einer Reduktion der Gesamtmenge dieser Moleküle mit zunehmendem Alter [94]. Aus diesen Vorgängen resultiert eine Verminderung der Wasserbindungsfähigkeit des Gewebes [164,165], welche wiederum weiteren Matrix degradierenden Prozessen Vorschub leistet [135]. Nach Antoniou et al. [12] werden drei Phasen des Matrix-turn-over der Bandscheibe unterschieden. In der Wachstumsphase (0-15 Jahre) werden Proteoglykan-Aggrecane, Prokollagen Typ I und II synthetisiert und Kollagen II vermehrt denaturiert. Die Reifungs- und Alterungsphase (15-40 Jahre) geht einher mit einer Reduktion der Synthese Matrix bildender Proteine und einer Reduktion der Kollagen Typ II- Denaturierung. Die fibrotische oder degenerative Phase (40-80 Jahre) ist gekennzeichnet durch einen Anstieg der Kollagen Typ II Denaturierung und einen leichten Anstieg der Synthese von Prokollagen Typ I ohne einen Anstieg der Synthese der Typ II Prokollagene und der Proteoglykan-Aggrecan-Synthese.

Die Ursachen dieser Prozesse liegen in der mit zunehmendem Alter zu beobachtenden Abnahme der Proteoglykane und der dadurch hervorgerufenen Verminderung des Wassergehaltes und in den Veränderungen der Endplatten, in denen eine Mineralisierung des Knorpels und eine Knochenneubildung stattfindet. Beide Prozesse führen zu einer relevanten Verschlechterung der Stoffwechselsituation der Zellen in der Bandscheibe [55,202]. Bibby et al. [20] konnten zeigen, dass der pH-Wert und die Konzentration an Sauerstoff und Glukose direkte Regulatoren der Aktivität intradiskaler Zellen sind. Diese sich gegenseitig regulierenden Faktoren beeinflussen direkt die Genexpression der Zellen und damit die Rate der Matrixsynthese- und degradation. Dass auch die Zellzahl vor allem über die Verfügbarkeit von Glukose reguliert wird, konnte von Horner und Urban [86] nachgewiesen werden. Eine generelle Verschlechterung der Stoffwechselsituation findet ihren Niederschlag in einer Erhöhung der Laktatkonzentration bei einer verminderten Sauerstoffkonzentration und in einem Absinken des pH-Wertes. Zu

beobachten ist eine Abnahme der Zellzahl, eine Veränderung der Eigenschaften der Zellen im Sinne der Zellularalterung, das heißt, einer Verminderung ihrer Transkriptionsleistung und ihrer Synthesekapazität. Weiter finden sich die schon oben angeführten Veränderungen in der Zusammensetzung und Konzentration der extrazellulären Matrix und eine Akkumulation degradierter Matrixanteile [20,29,86].

Diese ineinander übergehenden Prozesse der Bandscheibenalterung- und degeneration beruhen somit neben genetischen [11,101,105,178,209] sowohl auf mechanischen [4,5,6] als auch auf biochemischen Veränderungen [33,67], die sich wiederum gegenseitig beeinflussen können.

5.2.1 Entzündungsreaktion/ Immunantwort

Bei Protrusionen und Sequestern konnte die Infiltration von Bandscheibengewebe mit verschiedenen Entzündungszellen (CD 68-positiven Makrophagen, CD 25-positiven aktivierten T-Lymphozyten, CD 22-positiven B-Zellen und Mastzellen) nachgewiesen werden [45,75,143,150,156,211,217]. Diese Zellen wurden sowohl im Bandscheibengewebe selber als auch im umgebenden und eingewachsenen Granulationsgewebe bestimmt [143]. Kawaguchi et al. [106] konnten CD 11b und CD 11c sowie CD 40 positive Zellen nachweisen und interpretieren dies als Differenzierungsprozess von Monozyten zu Makrophagen. Diese könnten einen Beitrag bei der häufig zu beobachtenden spontanen Resorption von Sequestern leisten. Nerlich et al. [150] konnten CD 68-positive Makrophagen in degenerativ veränderten Bandscheiben im Gegensatz zu nicht degenerativ veränderten Kontrollen nachweisen. Morphologisch zeigten diese Zellen eine starke Ähnlichkeit mit den ortständigen Zellen, was zu der Annahme führte, dass es sich um eine Transformation ortständiger Zellen mit der Ausbildung phagozytotischer Eigenschaften handelt. Bei den in der zitierten Studie untersuchten Bandscheiben handelte es sich um Bandscheiben ohne Protrusion oder Sequestrierung.

Die von den oben genannten Entzündungs- und Immunzellen freigesetzten Entzündungsmediatoren führen zu einer Degradation der extrazellulären Matrix und damit zu einem Fortschreiten des Degenerationsprozesses [70]. So konnte nachgewiesen werden, dass die Proteoglycan-Matrix durch inflammatorische Zytokine wie Interleukin (IL)-1 α , Interleukin (IL)-1 β , Interleukin (IL)-6 und Tumor Nekrose Faktor- α (TNF α) degradiert wird [99,100,198]. Experimentelle Studien zeigten sowohl eine direkte toxische Wirkung der pro-inflammatorischen Zytokine (IL)-1 α , (IL)-1 β und TNF α , als auch eine Induktion Matrix degradierender Proteasen durch diese Zytokine [46,130,131,177,183]. So werden Metalloproteinasen (MMP`s) aktiviert, die wesentlich an der Degradation der extrazellulären Matrix beteiligt sind. Von den Subgruppen dieser Enzymfamilie können sämtliche Matrixanteile degradiert werden [37,97,177]. Die MMP`s werden in einer inaktiven Vorstufe synthetisiert. Die Umwandlung in die aktive Form wird von den sogenannten „tissue inhibitors of metalloproteinases“ (TIMPS) inhibiert und durch Zytokine und Wachstumsfaktoren

reguliert [37,61,148]. Die Störung des Gleichgewichtes dieser Faktoren führt zu einem Überwiegen der Matrix degradierenden Proteasen [46,97]. Kang et al. [99] wiesen nach, dass im Gewebe von Diskushernien eine höhere Synthese von MMP's als im Kontrollgewebe erfolgte. Ex vivo Studien mit Proben aus humanem Diskusmaterial und mit humanen monoklonalen Zellen aus der Bandscheibe zeigten eine verstärkte Gen-Expression und eine Freisetzung von Metalloproteinasen durch eine durch Leukozyten verursachte Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine [46]. In einigen Studien konnte eine Korrelation zwischen der Konzentration der MMP's und der Matrixdegradation und damit dem Grad der Degeneration hergestellt werden [37]. MMP-3 (Stromelysin) scheint nach einer Studie von Kanemoto et al. [97] eine besondere Rolle bei der Degeneration der kartilaginären Endplatten zu spielen. Eine Ausnahme stellt die MMP-19 dar, deren Konzentration in jugendlichen Bandscheiben am höchsten ist und mit dem Alter abnimmt. Diese MMP scheint über die Regulation des insulin-growth-factor (IGF) eine gegenüber der Degradation protektive Rolle zu spielen [68]. Eine direkte Beeinflussung der Genexpression und damit der Proteinsynthese in kultivierten Bandscheibenzellen durch TNF α wurde durch Séguin et al. [182] gezeigt. Hier wurden Gene, die an der Bildung von Matrixbestandteilen beteiligt sind, herunter reguliert und die Gene proteolytischer Enzyme hoch reguliert.

Weitere an der Matrixdegradation beteiligte Enzyme aus der Gruppe der Kathepsine wurden von Ariga et al. [13] nachgewiesen. Sie konnten zeigen, dass Kathepsin D und L in den Zellen degenerativer Bandscheiben nachweisbar sind. Diese Proteasen entfalten ihre Aktivität vor allem bei einem Absinken des pH-Wertes. Auch diese Enzyme werden über Zytokine aus den ortständigen Zellen oder von eingewanderten Makrophagen reguliert. Die Kathepsine D und K wurden in „tartrate-resistant acid phosphatase-positive multinucleated“ (TRAP) Zellen nachgewiesen. Diese vom Phänotyp her Osteoklasten ähnlichen Zellen sind an den Spalten zwischen der Endplatte und dem Wirbelkörper lokalisiert und scheinen an der Bildung dieser Spalten beteiligt zu sein.

In sequestrierten Bandscheiben konnte die Synthese des „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) nachgewiesen werden, dessen Bildung durch von

Makrophagen freigesetztes TNF α angeregt wird. Neben seiner bekannten angiogenetischen Eigenschaft scheint VEGF auch an der Umwandlung der MMP's von ihrer inaktiven in ihre aktive Form beteiligt zu sein [102].

Aggrecanasen, Proteoglykan-Aggrecane spaltende proteolytische Enzyme, spielen in der Degradation der extrazellulären Matrix ebenfalls eine Rolle [16,203]. MMP's und Aggrecanasen wirken unabhängig voneinander, wobei die Aggrecanasen insgesamt eine geringere Rolle im Bandscheibengewebe im Vergleich zum artikulären Knorpel spielen [173,195].

Entzündungsmediatoren, die im Gewebe degenerierter Bandscheiben nachgewiesen werden konnten, sind Prostaglandin E₂, Stickstoffmonoxid (NO) und O₂-Radikale [99,198]. Die Rolle von NO in der Bandscheibe ist nicht klar definiert. Jedoch weist die erhöhte Konzentration in degeneriertem Gewebe auf einen Zusammenhang zu der bekannten Beeinflussung lokaler inflammatorischer Prozesse durch dieses Molekül hin. Prostaglandin E₂ wird als Teil der Stoffwechsellkaskade angesehen, die zu einer Suppression der Proteoglykansynthese führt [99]. In ex vivo Kulturen von Bandscheibenzellen konnten Kang et al. [100] zeigen, dass die Synthese von NO, Prostaglandin E₂ und MMP's wesentlich von (IL)-1 reguliert wird. Eine sich gegenseitig beeinflussende regulatorische Rolle liegt in der Interaktion von Wachstumsfaktoren und der extrazellulären Matrix vor, hier wurden z.B. IGF und der growth factor [beta]-1 untersucht [68,158,196]. Von Spiliopoulou et al. [188] wurden Immunglobuline (IgG und IgM) in prolabierte Bandscheibengewebe nachgewiesen. Habtemariam et al. [73] und Satoh et al. [179] konnten die Präsenz von Antigen-Antikörper-Komplexen im perizellulären Bereich in operativ entfernten Diskushernien aufzeigen. In nicht hernierten Bereichen und in Kontrollbandscheiben konnten diese nicht nachgewiesen werden. Die Autoren interpretieren diese Beobachtung als Indiz für eine humoral vermittelte Beteiligung des Immunsystems, neben der bekannten Zellvermittelten Aktivierung an der lokalen Reaktion bei Bandscheibenvorfällen. Unterstützt wird diese These durch Arbeiten, die B-Lymphozyten im Gewebe analysierter Proben aus prolabierte Bandscheibengewebe nachweisen konnten [210,211].

5.2.2 Komplementaktivierung

Das Komplementsystem als Teil des angeborenen körpereigenen Abwehrsystems hat eine Reihe biologischer Effekte, vor allem bei der Auslösung und Vermittlung inflammatorischer Prozesse mit dem Ziel der Abwehr eindringender Pathogene. Hierbei kommt es über Bestandteile der Komplementkaskade zur Aktivierung von verschiedenen Zellen wie Leukozyten und Endothelzellen, zur Freisetzung von proinflammatorischen Anaphylatoxinen (C3a, C5a) und zur Aktivierung der Phagozytose [146]. Weiterhin hat das Komplementsystem eine wichtige Schlüsselfunktion in der Vermittlung zwischen den Systemen der angeborenen und erworbenen Immunität, z.B. über B- Zellen [142].

Das Komplementsystem kann über drei verschiedene Wege aktiviert werden. Beim so genannten „klassischen“ Weg erfolgt die Aktivierung über eine Interaktion des Moleküls C1q mit Antigen/Antikörperkomplexen. Der zweite mögliche Weg, der Lektinweg, wird über die Präsentation verschiedener Substanzen, wie Bakterien-Lipopolysacchariden, ausgelöst. Dabei bindet das Mannose bindende Lektin an eine antigene Oberfläche. Der dritte, so genannte „alternative Weg“, welcher der phylogenetisch älteste ist, kann durch die Präsentation von bakteriellen Zellmembranbestandteilen ausgelöst werden [189] (**Abb.8**).

Das Endprodukt der Komplementkaskade, der „membrane attack complex“ (MAC/C5b-9), hat eine direkt die Zellwand schädigende Wirkung und führt damit zu einem Gewebeuntergang im Bereich des entzündlich veränderten Gewebes. Die Zerstörung der Zellmembran erfolgt über die Bildung von Ionenkanälen, welche tubuläre Läsionen bilden und das Membranpotential und die Membranpermeabilität verändern [222]. Der MAC/C5b-9 führt weiterhin zu einer Verstärkung der TNF α vermittelten Hochregulierung von Endothel „E“-Selectin und „intracellular adhesion molecule-1“ (ICAM-1) in Endothelzellen und führt damit zu einer Verstärkung der inflammatorischen Reaktion [110].

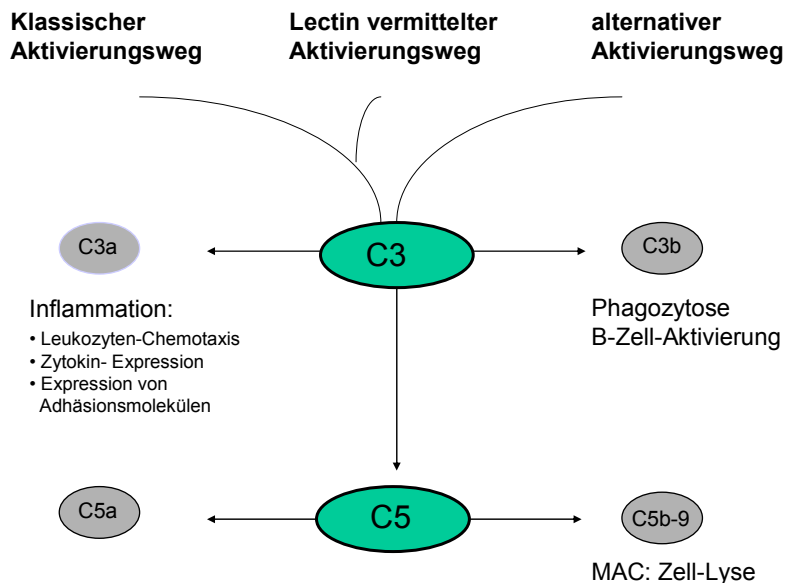


Abbildung 8: Schematisch vereinfachte Darstellung der Aktivierungswege des Komplementsystems.

Grönblad et al. [63] wiesen den MAC/C5b-9 in degenerierten Bandscheiben und im Untersuchungsmaterial von Diskushernien nach. In Kontrollen aus gesunden Bandscheiben ließen sich keine Mediatoren und Endprodukte aus der Komplementkaskade nachweisen. In den degenerierten Bandscheiben wurde eine höhere Konzentration des MAC/C5b-9 in den untersuchten Anteilen des Anulus fibrosus im Vergleich zum Nucleus pulposus beobachtet. Beruhend auf den vorliegenden Arbeiten, in welchen die Präsenz von Immunglobulinen und von Antigen-Antikörperkomplexen in degeneriertem Bandscheibengewebe nachgewiesen werden konnte [73,179,188], postulierten die Autoren die Aktivierung der Komplementkaskade Antigen-Antikörper vermittelt und damit über den klassischen Weg.

5.2.3 Programmierter Zelltod/ Apoptose

Bei der Apoptose handelt es sich um eine programmierte Form des Zelltods, der sich wesentlich von der Nekrose unterscheidet, vor allem dadurch, dass dieser selbstbestimmte Zelluntergang keine Entzündungsreaktion und keine lokale Gewebeschädigung auslöst [107,154]. Apoptose wird in allen Geweben von Säugetieren beschrieben und dient unter anderem der Regulation der Zellzahl, der Gewebe-Homöostase und der Abwehr [109]. Besonders in der Entwicklungs- und Wachstumsphase, aber auch bei einer Reihe von Erkrankungen spielt die Apoptose, dann im Sinne einer Dysregulation, eine zentrale Rolle [65].

Apoptotische Zellen lassen morphologisch eine Verminderung des Zellvolumens erkennen, weiterhin das so genannte „Blebbing“, welches Ausstülpungen an der Zytoplasmamembran beschreibt, sowie eine Chromatin-Kondensation und eine Fragmentation des Zellkerns und seiner DNA. Diese Zellfragmente werden von der Zellmembran eingeschlossen und als kleine Vesikel, den so genannten „apoptotic bodies“ phagozytiert, ohne dabei eine lokale Entzündungsreaktion hervorzurufen [134]. Verschiedene Stimuli können den programmierten Zelltod auslösen [15].

Dabei werden zwei Hauptwege zur Aktivierung der Apoptose unterschieden. Zum einen der Rezeptor vermittelte oder extrinsische und zum anderen der Mitochondrial vermittelte oder intrinsische Aktivierungsweg [169]. Der extrinsische Weg erfordert die Bindung eines Liganden (z.B. Fas-L) an einen so genannten, von der Zelle präsentierten, „death“-Rezeptor (z.B. Fas-Rezeptor). Darauf erfolgt eine Aktivierung intrazellulärer Proteine, die als Komplex „death inducing signaling complex“ (DISC) zu einer Aktivierung der Initiator-Caspase-8 führen, welche letztendlich über die Aktivierung der zentralen Effektor-Caspase-3 zur Apoptose führt. Die Aktivierung über den intrinsischen Weg erfolgt, wenn es über Apoptoseaktivatoren wie z.B. dem Tumor-Supressor P53, einem Transkriptionsfaktor, der durch Schädigung der DNA aktiviert wird, zu einem Ungleichgewicht der an die Membran der Mitochondrien gebundenen Proteine der B-cell-lymphoma-2 (Bcl-2)-Familie kommt. Vor allem eine Störung des Gleichgewichtes des anti-apoptotischen Bcl-2 mit dem pro-apoptotischem Bax führt zu Veränderungen der Membranstabilität des

Mitochondriums. Dieses führt zu einer Freisetzung von Substanzen, vor allem Cytochrom-C, welches im Zytosol Komplexe mit anderen Substanzen wie dem „apoptosis proetase-activating factor 1“ (Apaf 1) und Procaspasen bildet, die zusammen über eine Aktivierung der Initiator-Caspase-9 letztendlich zur Aktivierung der schon oben genannten Effektor-Caspase-3 führen (**Abb.9**).

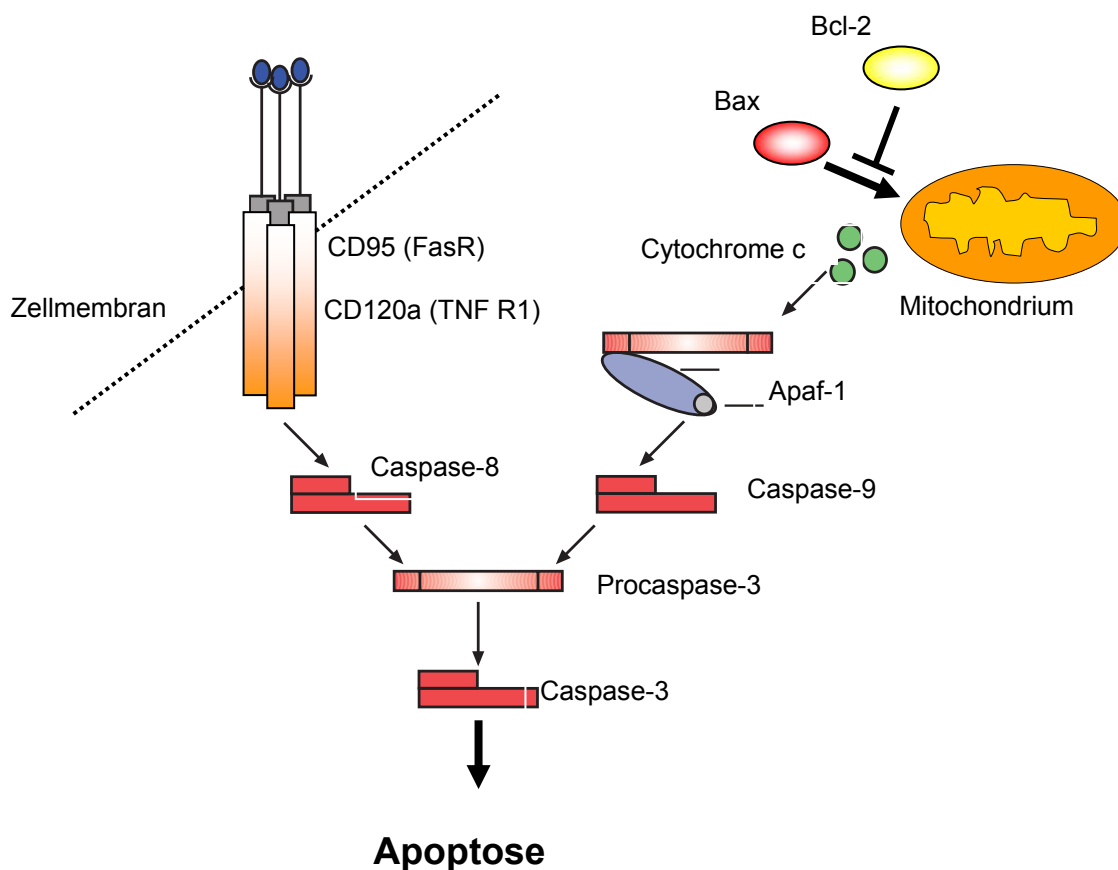


Abbildung 9: Schematisch vereinfachte Darstellung des extrinsischen (Rezeptor vermittelten) und des intrinsischen (mitochondrial vermittelten) Aktivierungsweges der Apoptose, der zwei wesentlichen intrazellulären Signalkaskaden der Apoptose.

Neben der Caspase-3 spielen auch andere Effektorcaspasen (Caspase-6, Caspase-7) eine zentrale Rolle in der irreversiblen Vermittlung der Apoptose [27,65,109,134,169]. Verbindungen dieser beiden Wege durch „BH3 interacting domain

death agonist“ (BID) werden beschrieben [162]. Ein dritter Weg, bei welchem es durch oxydativen Stress induziert und durch das endoplasmatische Retikulum vermittelt über Caspase-12 zur Auslösung der Apoptosekaskade kommt, ist noch nicht komplett untersucht [17,214]. Beschrieben wird weiterhin ein Caspase-unabhängiger Aktivierungsweg der Apoptose. Dabei kommt es über verschiedene Stimuli zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes der Proteine der Bcl-2-Familie und letztendlich zu einer Aktivierung von Proteasen, welche zur Apoptose führen [21].

Eine Reihe von Arbeiten zeigen, dass die Apoptose in der Degeneration der Bandscheibe über die Verminderung der Zellzahl und damit einer Beeinflussung der Gewebemöostase eine zentrale Rolle spielt [15,64,115,168].

Der Vergleich von Bandscheibenmaterial, welches bei der operativen Versorgung von Bandscheibenvorfällen gewonnen wurde, zeigte im Gegensatz zu Material aus humanen Kontrollgruppen ohne Bandscheibenvorfall eine deutliche Erhöhung der DNA-Fragmentation anhand TUNEL-positiver Zellen als Ausdruck einer verstärkten Apoptose [115]. Die Autoren konnten weiterhin eine signifikante lokale Erhöhung von Stickstoffmonoxid (NO) in operativ entferntem Bandscheibengewebe von Patienten mit Bandscheibenvorfällen nachweisen, ein Stoffwechselprodukt, welches ein möglicher Faktor für die Induktion der zellulären Apoptose ist. Gruber und Hanley [64,66] konnten in degenerativ verändertem Bandscheibengewebe ebenfalls Apoptose nachweisen. Die Rate korrelierte mit dem Alter und dem Degenerationsgrad. Die Autoren folgerten daraus, dass die Reduktion der Zellzahl und damit die Änderungen der Matrixsynthese wesentlich auf die Vorgänge des programmierten Zelltods zurückzuführen sind. Diese Resultate werden unterstützt durch die Ergebnisse von Ahsan et al. [8], die in Gewebe von extrahierten Bandscheibenvorfällen Apoptose anhand TUNEL- positiver histochemischer Untersuchungen und mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen und zusätzlich einer Erhöhung der Caspase-3-Aktivität, dem Schlüsselenzym der Apoptosekaskade, nachweisen konnten. Weiterhin wurde ein Anstieg der Lipid-Peroxydation gezeigt, verursacht durch eine Reduktion des Sauerstoffgehaltes, diese führt ebenfalls zu einer Erhöhung der Caspase-3-Aktivität. Eine Aktivierung der Caspase-9 abhängigen mitochondrialen Apoptose wurde in einem Mausmodell

in Bandscheiben nach mechanischer Überbelastung beschrieben [168]. Dabei wurden sowohl eine Erhöhung der Aktivität der Caspase-9 und eine Herabsetzung des Membranpotentials der Mitochondrien als auch eine verstärkte intrazelluläre Freisetzung von Cytochrom-C nachgewiesen. Diese Untersuchung zeigt klar die Aktivierung der intrinsischen, mitochondrial vermittelten Apoptose als einen möglichen Mechanismus der Induktion der Degeneration. Die Untersuchungen von Park et al. [162] bestätigten, dass die Apoptose in den Zellen degenerierter Bandscheiben mitochondrial vermittelt wird. Dazu wurden von den Autoren neben TUNEL-positiven Zellen Cytochrom-C, „BH3 interacting domain death agonist“ (BID), Caspase-9 und Caspase-3 nachgewiesen. Caspase-8 war im Gegensatz dazu nicht signifikant hoch reguliert. Weiterhin konnte eine Expression des für die Apoptose relevanten Fas (CD95) Rezeptors auf Zellen in degenerativ verändertem Bandscheibengewebe von operativ entfernten Bandscheibenvorfällen im Tierversuch nachgewiesen werden. Die Expression des Fas-Rezeptors zeigte sich in nur vorgewölbten Bandscheibenvorfällen signifikant herabreguliert, im Vergleich zu schon sequestrierten Bandscheibenvorfällen in untersuchten humanen, operativ gewonnenem Gewebe [160,161]. Die Expression des Fas-Liganden (FasL) in untersuchten Bandscheibenzellen von Patienten mit degenerativen Veränderungen [160,161] und in Bandscheibenzellen von Patienten mit Skoliose [34] wurde ebenfalls beschrieben. Von Takada et al. [197] wurde auch auf Nucleus pulposus-Zellen nicht degenerativ veränderter Bandscheiben FasL nachgewiesen. Damit wurde eine Immunprivilegierung dieser Zellen postuliert, da auch andere Kriterien immunprivilegierter Zellen wie eine Blut-Gewebe-Barriere und eine fehlende Lymphdrainage neben der lokalen Expression von FasL für dieses Gewebe zutreffen. Diese These wird durch die Ergebnisse von Inui et al. [89] gestützt. Die Autoren konnten die Expression von Fas-L schon in Zellen der embryonalen Bandscheibe nachweisen.

Ein Anstieg apoptotischer Zellen in den kartilaginären Endplatten mit zunehmendem Alter und ein Anstieg der Apoptose im Spondylosemodell im Sinne der Apoptoseinduktion durch mechanischem Stress konnten von Ariga et al. [14] im Mäusemodell nachgewiesen werden. Da der Zusammenhang der altersbedingten Veränderungen der Endplatte mit der Degeneration der Bandscheibe bekannt ist

[55,56], handelt es sich hier um einen weiteren Mechanismus, der geeignet ist, den Zusammenhang zwischen Apoptose und Degeneration zu erhellen. Experimentelle Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen dem Grad der einwirkenden Belastung und den daraus resultierenden degenerativen Veränderungen an der Bandscheibe von Mäusen haben ergeben, dass eine quantitative Korrelation zwischen der einwirkenden Last und dem Grad der Degeneration besteht. Dabei konnte eine Zunahme des programmierten Zelltodes bei den Chondrozyten der kartilaginären Endplatte in Abhängigkeit von der einwirkenden Last nachgewiesen werden [15]. Lotz und Chin [134] zeigten in einem Maus-Modell in vivo, dass eine Korrelation zwischen der Stärke und der Dauer der auf die Bandscheibe einwirkenden Kompressionskraft und der Zahl apoptotischer intradiskaler Zellen besteht. Bei niedriger einwirkender Kraft wurden apoptotischen Zellen im Anulus fibrosus gefunden. Mit der Zunahme der einwirkenden Kräfte kam es zur Apoptose in der Zellen der kartilaginären Endplatte und zuletzt in den Zellen des Nucleus pulposus. Für eine mechanische Beeinflussung der Apoptose sprechen auch die Ergebnisse von Chen et al. [34], die zeigen konnten, dass bei Skoliosen die Anzahl apoptotischer Zellen in den Apex-Bandscheiben höher ist als in den apexfernen Bandscheiben.

Modell-Studien der letzten Zeit ergaben Erfolge beim Einsatz anti-apoptotischer Agenzien, wie spezifischer Caspase-Inhibitoren oder Wachstumsfaktoren, im Sinne der Verminderung der Apoptose-Rate der Zellen in degenerativ veränderten Bandscheiben [15,66,168].

5.2.4 Mechanische Belastung und Degeneration

Die mechanische Belastung der Bandscheibe stellt einen wichtigen Regulator der Produktion der extrazellulären Matrix dar [131,212]. Mechanische Lastwechsel im physiologischen Bereich stellen einen Stimulus der Synthese der extrazellulären Matrix und der Inhibition von Matrix degradierenden MMP's dar [78,91]. MacLean et al. [137] konnten ein unterschiedliches Verhalten der Zellen des Anulus fibrosus im Vergleich zu den Zellen des Nucleus pulposus in Abhängigkeit von der Stärke, der Dauer und der Frequenz der einwirkenden Kraft beobachten. Während die Zellen des Anulus fibrosus schon nach kurzzeitiger Belastung (0,5 Stunden) mit einer verstärkten Genexpression und Synthese sowohl anaboler als auch kataboler Proteine (Kollagen Typ I und Typ II, MMP-3 und MMP-13) reagierten, kam es zu einer Synthesesteigerung in den Zellen des Nucleus pulposus (ADAMTs-4, MMP-3 und MMP-13) erst nach längerer Einwirkzeit (2 bis 4 Stunden). Diese Beobachtungen werden im Rahmen physiologischer dynamischer Belastungszyklen als Steigerung des Zellstoffwechsels zur Aufrechterhaltung der Matrixhomöostase interpretiert. Auf Grund der limitierten Dauer der einwirkenden Kräfte können aus dieser Studie keine Schlüsse auf die Auswirkung von Langzeitbelastungen gezogen werden. Biomechanische Versuche an Rattenbandscheiben *in vivo* bestätigten, dass eine dosierte Belastung zu einem Anstieg der Proteoglykansynthese ohne eine wesentliche Änderung der biomechanischen Eigenschaften führte. Eine Steigerung der Belastung sowohl in der Intensität als auch in der Dauer führte dann aber zu einer Verminderung der Proteoglykansynthese. Damit einher gingen strukturelle Veränderungen, dabei kam es zu einer Höhenminderung der Bandscheibe mit einer resultierenden Verschlechterung der biomechanischen Parameter, wie sie zum Teil von degenerierten Bandscheiben bekannt sind [88].

Adams und Dolan [6] zeigten, dass eine exzessive mechanische Belastung einen der Hauptgründe für die Degeneration der Wirbelsäule und die daraus resultierenden Probleme darstellt. Der Zusammenhang zwischen unphysiologischer mechanischer Belastung und dem Grad der Degeneration der Bandscheibe ist daher Gegenstand vieler experimenteller Untersuchungen [90,155,199]. Lotz et al. [133] konnten in einem *in vivo* Maus-Modell demonstrieren, dass eine permanente

statische Kompression der Bandscheiben zu einer Reihe von Veränderungen führt, wie sie in degenerativen Bandscheiben zu beobachten sind. Dazu gehören eine erhöhte Apoptoserate mit einer Reduktion der Zellzahl und eine Verminderung der Syntheserate von Kollagen Typ II und Proteoglykanen. Hutton et al. [87] zeigten gleiche Ergebnisse nach statischer Belastung von Hundebandscheiben. Zusätzlich wiesen sie einen Anstieg der Kollagen Typ I-Synthese im Nucleus pulposus unter statischer Belastung nach. Dieses für diese Region untypische Kollagen führt zusammen mit der verminderten Syntheseleistung von Kollagen Typ II und Proteoglykanen zu einer dramatischen Veränderung der Architektur der Bandscheibe. Es wurden eine verminderte Fähigkeit zur Bindung von Wasser [155], eine Verschlechterung der Ernährungssituation der Bandscheibe [55] und eine Verminderung der Möglichkeit der regelrechten Aufnahme und Verteilung einwirkender Kräfte [3] nachgewiesen. Ishihara et al. [91] untersuchten ebenfalls belastungsabhängige Veränderungen nach hydrostatischer Kompression in bovinen und humanen Bandscheiben in vitro. Die Autoren stellten einen anabolen Effekt nach dosierter Kompression, abhängig von der Last und der Einwirkzeit, fest. Sowohl nach der Erhöhung des Druckes als auch nach der Verlängerung der Einwirkzeit wurden der Zellmetabolismus und damit die Matrixsynthese reduziert. Die Autoren postulieren, dass vor allem die Reduktion des Wassergehaltes für diese Veränderungen verantwortlich ist. Kröber et al. [122] zeigten nach statischer Kompression ebenfalls signifikante Veränderungen bezüglich der Bandscheibenhöhe, ihrer Mikroarchitektur und einen Anstieg apoptotischer Zellen. Adam und Lotz [2] konnten unter statischer Belastung in Mäusebandscheiben einen signifikanten Anstieg der Umwandlung der MMP-2 von ihrer inaktiven in ihre aktive Form nachweisen. MMP-2 ist involviert in den Katabolismus der extrazellulären Matrix. Ein Anstieg der Synthese der MMP-3 und einen Abfall der Konzentration des entsprechenden Inhibitors TIMP-1 unter einem unphysiologisch hohen ($>30\text{atm}$) und ebenfalls unter einem unphysiologisch niedrigen ($<3\text{atm}$) hydrostatischen Druck konnte von Handa et al. [78] nachgewiesen werden.

In ex vivo Modellen wurde der Zusammenhang zwischen der druckabhängigen Freisetzung von NO und der Synthese extrazellulärer Matrix anhand des Parameters Proteoglykan von Liu et al. [131] in Proben aus humanen lumbalen

Bandscheiben gemessen. Der durch eine Druckerhöhung verursachte Anstieg von NO führte zu einer Verminderung der Produktion extrazellulärer Matrix. Für die Ausprägung des Grades der Degeneration spielen neben der Art und Intensität der einwirkenden mechanischen Last nach Callaghan et al. [31] auch die Bewegungsausschläge in Extension und Flexion eine ausschlaggebende Rolle. Andere Belastungsformen, wie eine andauernde Vibrationsbelastung [90] oder eine Dauertraktion [199], führen ebenfalls zu metabolisch negativen Effekten mit einer verminderten Hydratation der Bandscheibe bei einem Absinken der Proteoglykansynthese. Eine Immobilisation der Bandscheibe von Mäusen im Sinne einer negativen Belastung zeigte einen Rückgang der Kollagen-II-Synthese [36].

Dass der Effekt einer dynamischen und damit der Realität mehr entsprechenden Belastung ebenfalls abhängig von der Größe und der Dauer sowie von der Frequenz der einwirkenden Kraft ist, konnte von Walsh und Lotz [212] anhand eines in vivo Mausmodells und von Kröber et al. [123] anhand eines in vivo Kaninchenmodells belegt werden. Physiologische Belastungen führten zu anabolen Effekten. Veränderungen der Parameter über physiologische Grenzwerte hinaus führten zur Apoptose von Diskuszellen, zur Reduktion der Expression von Matrixgenen und damit zu einer Verminderung der Matrixsynthese. Es kam zu einer Verminderung der Bandscheibenhöhe und zu Veränderungen der Mikroarchitektur der Bandscheibe.

In verschiedenen Tiermodellen wird Chondroitinase ABC genutzt, um die Degeneration von Bandscheiben des Nacktmulls zu simulieren. Die eingespritzten Proteasen führen zu Veränderungen wie Höhenminderung der Bandscheibe, zu einer Verminderung des Anteils der Proteoglykane und einer Reduktion von Zellen, wie sie für degenerative Bandscheiben typisch sind. Das Ziel dieser Modelle ist die Etablierung reproduzierbarer Versuchsanordnungen, um experimentelle Behandlungsprotokolle zur Therapie der degenerativen Veränderungen evaluieren zu können [153].

5.2.5 Trauma und Degeneration

Traumatisch bedingte Veränderungen der Bandscheibe nach direkter Schädigung der Bandscheibe oder Schädigung der angrenzenden Strukturen wurden in verschiedenen in vivo und ex vivo Modellen untersucht.

Biomechanische Modellemessungen an humanen Wirbelsäulenpräparaten zeigen, dass die Entfernung des Nucleus pulposus als Defektmodell zu einem signifikanten Verlust von Stabilität im Bewegungssegment führt [190]. Artificielle Deckplattenverletzungen führten bei simulierten Fraktursituationen zu einer Zunahme der Instabilität besonders unter Torsionsbelastungen [191]. Nach direkter Schädigung in vivo fanden Carreon et al. [32] im Bereich traumatisch prolabierter Sequester an der HWS in den dadurch entstandenen Defektzonen resorptive Vorgänge, zerstörte Endplattenanteile blieben nachweisbar. Nach artifizialen transversalen Inzisionen, durch die komplette Ausdehnung des Anulus fibrosus in die Tiefe bei Hundebandscheiben in vivo, konnte von Hampton et al. [77] gezeigt werden, dass eine komplette Heilung dieser Verletzung nicht erfolgte. Oberflächliche Verletzungen des Anulus fibrosus lassen eine bessere Heilungstendenz so lange erkennen, wie die Blutversorgung des äußeren Anulusanteils aus der Umgebung gewährleistet ist. Tiefere Verletzungen des Anulus fibrosus zeigen keine Heilungstendenz, vor allem wohl in Abhängigkeit von der in der Tiefe fehlenden Gefäßversorgung [98,159]. Osti et al. [159] konnten anhand histologischer Untersuchungen belegen, dass oberflächliche Verletzungen des Anulus fibrosus zu progressiven Veränderungen über die ganze Ausdehnung des Anulus führen können. Dabei bilden sich Fissuren, welche degenerative Veränderungen beschleunigen. Anhand eines solchen Inzisionsmodells konnten im Langzeitverlauf signifikante Veränderungen in der gesamten Bandscheibe nachgewiesen werden. Dazu gehörten eine Höhenminderung und Fibrosierung des Nucleus pulposus, ein Verlust der typischen Struktur des Anulus fibrosus, ein verminderter Flüssigkeitstransport und eine Veränderung in der Proteoglykankonzusammensetzung [96]. Weiterhin konnte ein Anstieg von Kollagen und von am Kollagenumsatz beteiligten Enzymen beobachtet werden [95].

Untersucht wurde auch die Änderung der Genexpressionsmusters von Zellen der Kaninchenbandscheibe nach einer artifiziellen Verletzung des Anulus fibrosus durch eine Inzision [10]. Hier zeigte sich eine Hochregulierung von Genen, die Proteine verschlüsseln, welche in degenerierten Bandscheiben vermehrt synthetisiert werden, wie z.B. der Gene verschiedener MMP's.

Biomechanische Versuche, in denen durch Kompression eine Fraktur der Endplatte verursacht wurde, konnten zeigen, dass es zu einer signifikanten Veränderung der Stressverteilung in der angrenzenden Bandscheibe kam. Durch die Endplattenfraktur wurde eine Dekompression des Nucleus pulposus mit einer nachfolgenden Mehrbelastung des Anulus fibrosus verursacht. Konsekutive zyklische mechanische Belastungen verschlechterten die Situation durch einen partiellen Kollaps von Anulus fibrosus Fasern [5]. Damit kann eine relativ kleine Verletzung des Wirbelkörpers (Endplatte), welche lokal eine gute Heilungstendenz aufweist, zu bleibenden Störungen in der angrenzenden Bandscheibe führen. Die mit der Heilung verbundene Änderung der Permeabilität der Endplatte [55], die Störung der Integrität des viskoelastischen Systems Bandscheibe mit der daraus folgenden Änderung der Stressverteilung [5] und die damit verbundene Auslösung inflammatorischer Reaktionen [98] führen zu einer Störung der Homöostase und zu einer Initiierung von intradiskalen Veränderungen, die zu einer verfrühten Bandscheibendegeneration führen können. Kertulla et al. [108] konnten diese Beobachtungen anhand klinischer Verläufe mit Bandscheibendegeneration nach Wirbelkörperfrakturen untermauern.

Hadjipavlou et al. [76] konnten einen Anstieg von im dorsalen Ganglion produzierten Neuropeptiden (calitonin gene related peptide, Substanz P und vasoactive intestinal peptide) nach einem experimentellen Torsionstrauma der lumbalen Wirbelsäule im Kaninchenmodell nachweisen. Diese Substanzen sind direkt oder im Sinne von Mediatoren an der Degradation der extrazellulären Matrix beteiligt.

Es liegen Ergebnisse aus Arbeiten vor, die sich mit der Rolle der Entzündungsreaktion in einem Traumamodell lumbaler Bandscheiben-Verletzungen beim Schwein auseinandersetzen [74,98]. Nach definierten Schädigungen des Anulus fibrosus durch Inzisionen mit einem Skalpell konnte eine Infiltration des geschädigten Areals mit CD3-positiven Lymphozyten innerhalb einer Woche nach Trauma nachgewiesen werden. Weiterhin konnte einen Monat nach Trauma eine CD68-positive Makrophageninfiltration immunhistochemisch nachgewiesen werden [98]. Auch Habtemariam et al. [74] konnten eine Infiltration artifiziell verletzter Areale mit CD3-positiven Lymphozyten und mit CD68-positiven Makrophagen zeigen.

6. Arbeitshypothese

Die traumatisch induzierte Entzündungsreaktion in der Bandscheibe von Patienten, welche eine Wirbelkörperfraktur erlitten haben, führt über eine Reihe verschiedener, sich zum Teil gegenseitig bedingender zellulärer und molekularer Mechanismen zu einer progressiven Destruktion der Mikro- und ggf. daraus resultierend der Makrostruktur der Bandscheibe. Dazu gehören die Chemotaxis von Entzündungs- und Immunzellen, die Aktivierung der Komplementkaskade und die Induktion der Apoptose-Kaskaden, die zum programmierten Zelltod führen. Die durch diese Mechanismen ausgelösten progressiven Veränderungen der Bandscheibe könnten im weiteren Verlauf zur verfrühten Degeneration führen. Folgen wie ein sekundärer Höhenverlust, die Ausbildung einer segmentalen Instabilität und die Ausbildung einer sekundären posttraumatischen Korrekturverlustes könnten induziert werden.

6.1 Spezifische Schritte zur Analyse der Veränderungen in Bandscheiben der thorakolumbalen Wirbelsäule nach Trauma

6.1.1 Analyse des zu untersuchenden Gewebes

Die Analyse des zu untersuchenden Gewebes beginnt mit einer Hämatoxylin-Färbung zur Darstellung der typischen histomorphologischen Strukturen der Bandscheibe. Mittels einer Übersichtsfärbung für Kollagen und spezifischer immunhistochemischer Färbungen für Kollagen Typ- I und Kollagen Typ- II werden die für die Bandscheibe typischen Kollagene dargestellt.

6.1.2 Analyse des Musters der lokalen posttraumatischen Entzündungsreaktion

Gewebeschnitte aus Bandscheiben, die an frakturierte Wirbelkörper angrenzen, werden mit immunhistochemischen Methoden gefärbt und mittels spezifischer Marker auf infiltrierende Entzündungszellen untersucht. Weiterhin wird das Ausmaß

der Entzündungsreaktion über für Fragmente der Aktivierung des Komplementsystems spezifische Färbungen analysiert. Die zelluläre Infiltration und der Nachweis membranständiger Bestandteile der Komplementkaskade werden zwischen den drei Untersuchungsgruppen deskriptiv verglichen.

6.1.3 Messung des programmierten Zelltodes/Apoptose der intradiskalen Zellen

Analysiert wird die posttraumatische zelluläre Apoptose unter Nutzung der „terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling“ (TUNEL)-Methode. Zum Nachweis der Apoptose intradiskaler ortsständiger Zellen werden HE- Schnitte analysiert und auf morphologisch typische Zeichen für deren Apoptose untersucht. Die Analyse und Quantifizierung der Initiator-Caspasen 8 und 9 und der Effektorcaspasen 3/7 als zentraler Bestandteile der Apoptosekaskade erfolgt in Gewebe- Homogenisaten.

6.1.4 Analyse der Gen-Expression und der Synthese von zentralen Mediatoren der Apoptose

Die Expression von pro- und antiapoptotischen Mediatoren und Komponenten des extrinsischen und des intrinsischen Weges der Apoptosekaskade im traumatisierten Bandscheibengewebe wird mittels Bestimmung der mRNA analysiert. Die Gen-Expression mittels RT-PCR in homogenisierten Gewebeproben gemessen. Die Expression der Mediatoren wird zwischen den drei Untersuchungsgruppen verglichen. Um auch die erhöhte Syntheseleistung der betroffenen Zellen hinsichtlich der untersuchten Apoptosemediatoren bestätigen zu können, werden zusätzlich immunhistochemische Färbungen für einige dieser Mediatoren durchgeführt.

7. Material und Methoden

7.1 Patienten

Patienten unserer Klinik (Klinik für Unfall- Orthopädische- und Wiederherstellungschirurgie, Charité - Campus Benjamin Franklin) mit instabilen und operationspflichtigen Frakturen der thorakolumbalen Wirbelsäule, mit degenerativen Erkrankungen der Lendenwirbelsäule und mit Wirbelkörperpathologien, die zur Entfernung der angrenzenden Bandscheibe führten, wurden nach entsprechender Aufklärung und Einwilligung anhand des von der Ethikkommission genehmigten Aufklärungs- und Informationsbogens (Anhang 1 und 2) in die Studie eingeschlossen. Dabei wurden die unten aufgeführten Ausschlusskriterien beachtet.

Untersuchungsgruppe:

Entsprechend den Empfehlungen von Harms und Tabasso [80] führen wir bei operationspflichtigen Frakturen der thorakolumbalen Wirbelsäule regelmäßig eine zweizeitige dorsoventrale Versorgung durch. Das Ziel dieser Vorgehensweise ist eine Wiederherstellung sowohl der vorderen lasttragenden als auch der hinteren zugbelasteten Anteile der Wirbelsäule, um eine der Biomechanik der Wirbelsäule optimal angepasste Rekonstruktion zu erreichen. Diesen Patienten wurden intraoperativ die an die Fraktur angrenzenden und im Rahmen der ventralen Versorgung ohnehin zu entfernenden Bandscheiben entnommen und zur Untersuchung asserviert.

Positive Kontrollgruppe:

Als positive Kontrollgruppe wurden Bandscheiben von Patienten mit degenerativen Erkrankungen, die mittels einer versteifenden Operation therapiert wurden, entnommen und untersucht. Die Patienten wurden entsprechend den oben genannten Voraussetzungen in die Studie eingeschlossen.

Negative Kontrollgruppe:

Für die negative Kontrollgruppe wurden in der Bildgebung unauffällige Bandscheiben von Patienten gewonnen, bei denen Erkrankungen des Wirbelkörpers zu einer operativen Entfernung des Wirbelkörpers mit den angrenzenden gesunden Bandscheiben führten.

Ausschlusskriterien:

Ausschlusskriterien für Patienten aller untersuchten Gruppen waren eine Steroidmedikation oder eine Medikation mit anderen immunsuprimierenden Pharmaka, Osteoporose, bakterielle Entzündungen und Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises. Alle diese Veränderungen werden in unserer Abteilung standardmäßig anamnestisch, klinisch, laborchemisch und bildgebend erfasst.

7.1.1 Untersuchungsgruppe: Frakturen der thorakolumbalen Wirbelsäule

In die Gruppe mit Frakturen der thorakolumbalen Wirbelsäule konnten 17 Patienten mit 18 Bandscheiben eingeschlossen werden. Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Bandscheibenentnahme betrug 40,6 ($\pm 13,3$; 21-59) Jahre, bei fünf Frauen und zwölf Männern. Die demographischen Daten, die Daten zum Frakturtyp und zur erfolgten operativen Versorgung sind **Tabelle 1** zu entnehmen.

Nr	Alter	Geschl.	Diagnose	Begleiterkrankungen	Begleitverletzungen	OP
C 01	28	m	Multiple WK-Frakturen (Th5,6,7 und 10), Th10 <u>Typ A.3.1.</u>	-	Lungenkontusion Claviculafraktur	Dorsale Stabilisierung Th5- Th11 und ventrale part. Korporektomie Th10, Spondylodese Th9/10, BS- Resektion Th9/10
C 02	31	m	LWK- 1-Fraktur <u>Typ A 3.1</u>	-	Thoraxprellung	Dorsale Stabilisierung Th12 bis L2, ventrale part. Korporektomie und Spondylodese Th12-L1, BS-Resektion Th12/L1

C 03	33	m	Fraktur Th12 <u>Typ A.3.1</u>	-	-	Dorsale Stabilisierung Th11- L1, ventrale part. Korporektomie Th12 Spondylodese Th11/12, BS- Resektion Th11/12
C 04	47	m	LWK- 3-Fraktur <u>Typ A 3.3</u> Discoligamentäre Zerrreißung Th12/L1 <u>Typ B 1.1</u>	Schizophrenie	Polytrauma mit Oberschenkel-Tibiakopf-Sprunggelenksfraktur, Symphysensprengung	Dorsale Spondylodese Th12- L4, ventrale Korporektomie L3 und Spondylodese L2-4, BS- resection L2/3 und L3/4 Intersomatische Fusion Th12/L1, BS- Resektion Th12/L1
C 05	27	m	BWK- 5-Fraktur <u>Typ A 3.1</u>	-	-	Dorsale Stabilisierung Th4-6, ventrale part. Korporektomie Th5 und Spondylodese Th4-5, BS- Resektion Th4/5
C 06	21	m	BWK- 6-Fraktur <u>Typ C 1</u>	-	Polytrauma mit Lungenkontusion Hämatothorax, Claviculafraktur, inkomplettem Querschnitt sub Th6	Dorsale Spondylodese Th4 bis 8 und Dekompression Th5/6 Ventrale part. Korporektomie Th6 und Spondylodese Th4-6, BS- Resektion Th4/5
C 07	54	w	BWK- 5-Fraktur <u>Typ B 1.1</u>	-	Thoraxkontusion Sternumfraktur	Dorsale Spondylodese Th4 bis 6, ventrale Korporektomie Th5 und Spondylodese Th4-6, BS- Resektion Th 5/6
C 08	43	m	LWK- 2-Fraktur <u>Typ B 2.2</u>	Manisch depressives Syndrom	Pneumothorax, Radiusköpfchenfraktur	Dorsale Spondylodese Th12 bis L2, ventrale intersomatische Fusion Th12 –L1, BS- Resektion Th12/L1
C 09	28	m	LWK- 1-Fraktur <u>Typ A 3.1</u>	-	-	Dorsale Spondylodese Th12 bis L2, ventrale part. Korporektomie L1 und Spondylodese Th12/L1, BS- Resektion Th12/L1
C 10	39	m	BWK- 8-Fraktur <u>Typ B 1.2</u>	-	Fraktur BWK 9 und BWK 11, stabil Typ A 1.1	Dorsale Spondylodese Th7bis 9, ventrale part. Korporektomie Th8 und Spondylodese Th7-9, BS- resection Th7/8 und 8/9
C 11	59	m	LWK- 1-Fraktur <u>Typ A 3.1</u>	-	-	Dorsale Spondylodese Th12 bis L2, ventrale part. Korporektomie L1 und Spondylodese Th12-L1, BS- Resektion Th12/L1
C 12	48	w	LWK- 4-Fraktur <u>Typ A 3.3</u> Luxationsfrakt. Th12/ L1 <u>Typ B 1.1</u>	Depression	Polytrauma mit Lungenkontusion bei Rippen-Serienfraktur, Leberhämatom, Conus- Cauda-Syndrom	Dorsale Spondylodese Th 12 bis S1, ventrale intersomatische Fusion Th12/L1, BS- Resektion Th12/L1 , Korporektomie L4 und Spondylodese L3 bis L5
C 13	26	w	LWK- 1-Fraktur <u>Typ A 3.2</u>	-	-	Dorsale Spondylodese Th12 bis L2, ventrale part. Korporekt., Spondylodese Th12-L2, BS- Resektion Th12/L1 und L1/2
C 14	64	m	LWK- 3-Fraktur <u>Typ A 3.2</u>	-	-	Dorsale Spondylodese L2 bis L4, ventrale part. Korporektomie und Spondylodese L2-L4, BS- Resektion L2/3 und L3/4

C 15	39	m	BWK- 12- Fraktur <u>Typ A 3.1</u>	Epilepsie	-	Dorsale Spondylodese Th11 bis L1, ventrale part. Korporektomie Th12 und Spondylodese Th11-12, BS- Resektion Th11/12
C 16	44	w	LWK- 1-Fraktur <u>Typ A 3.1</u>	-	-	Dorsale Spondylodese Th12 bis L2, ventrale part. Korporektomie L1 und Spondylodese Th12-L1, BS- Resektion Th12/L1
C 17	59	w	LWK- 1-Fraktur <u>Typ A 3.2</u>	Hypothyreose	-	Dorsale Spondylodes Th12 bis L2, ventrale part. Korporektomie L1 und Spondylodese Th12-L2, BS- Resektion Th12/L1 und L1/2

Tabelle1: Demographische Übersicht der auf Grund instabiler Frakturen der thorakolumbalen Wirbelsäule operativ dorsoventral versorgten Patienten (n=17, 18 Bandscheiben). Gezeigt werden neben den demographischen Daten die Lokalisation des verletzten Segmentes, Begleiterkrankungen, die Frakturklassifikation und die Art der operativen Versorgung.

7.1.2 Positive Kontrollgruppe: Bandscheibendegeneration

In die Gruppe der Patienten mit degenerativen Veränderungen der Bandscheibe, die letztendlich über eine Degeneration des Bewegungssegmentes operationspflichtig wurden, konnten sechs Patienten mit acht Bandscheiben eingeschlossen werden. Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Bandscheibenentnahme betrug 57,8 ($\pm 11,4$; 41-69) Jahre bei fünf Frauen und einem Mann. Die demographischen Daten, die Daten zur Klassifizierung des Grades der Degeneration und zur erfolgten operativen Versorgung sind **Tabelle 2** zu entnehmen. Die Graduierung der Degeneration erfolgte an Hand von Röntgen- und MRT- Bildern und ist unten (**Tabelle 3 und 4**) im Detail aufgeführt.

Nr	Alter	Geschl.	Diagnose	Grad der Degeneration	Begleit- erkrankungen	OP
A 1	68	m	Osteochondrose, spinale Stenose L3/4	Radiolog.: III MRT: V	Hypertonie	Dekompression und PLIF L3/4, Resektion der BS L3/4
A 2	67	w	Spinale Stenose und Instabilität Osteochondrose, Spondylarthrose L2/3 und L3/4	Radiolog.: II; II MRT: IV; III	Hypertonie Asthma bronchiale	Dorsale Dekompression und Instrumentation L2 bis L4, ventrale Fusion L2/3 und L3/4

A 3	57	w	posttraumatische Kyphose L1 mit Degeneration der angrenzenden Bandscheiben	Radiolog.: II, II MRT: III, III	Leberzirrhose	Dorsoventrale Korrektur-spondylodese Th12 bis L2 mit Korporektomie L1, BS-resektion Th12/L1 und L1/2
A 4	69	w	Spinale Stenose bei degenerativer Olisthese L4/5	Radiolog.: III MRT: IV	-	Dekompression und Repositions-PLIF L4/5, BS- resektion L4/5
A 5	41	w	Postnukleotomie-Syndrom L5/S1	Radiolog.: II MRT: IV	-	Dorsoventrale Distractionsspondylodese L5/S1, BS- Resektion L5/S1
A 6	45	w	Postnukleotomie-Syndrom L4/5 und L5/S1, massive Osteochondrose L4 bis S1	Radiolog.: II MRT: IV	-	Dekompression und PLIF L4/5 und L5/S1, BS- Resektion L4/5 und L5/S1

Tabelle 2: Demographische Übersicht über die auf Grund degenerativer Erkrankungen der Wirbelsäule operativ versorgten Patienten (n=6). Gezeigt werden neben den demographischen Daten die Lokalisation des erkrankten Segmentes, die radiologische und die MRT-basierte Klassifikation des Grades der Degeneration, Begleiterkrankungen und die erfolgte operative Versorgung.

Röntgenologische Klassifizierung der Bandscheibendegeneration:

Die röntgenologische Klassifizierung des Grades der Degeneration der Bandscheibe, die in der Gruppe der degenerativen Bandscheiben Anwendung fand, ist in der nachstehenden Tabelle entsprechend den Empfehlungen von Tiedjen und Müller [201] aufgeführt. (**Tabelle 3**)

Grad der Degeneration	Intervertebralraum	Wirbelkörper
I	Minimale Höhenminderung	Regelrechte Knochenstrukturen
II	Deutliche Höhenminderung	Fokale Sklerose der Endplatten, Initiale Spondylose
III	Höhenminderung > 75% der ursprünglichen Bandscheibenhöhe	Diffuse Sklerose der Endplatten, deutliche Spondylose

Tabelle 3: Nativröntgenologische Klassifikation der Degeneration der Bandscheibe nach Tiedjen und Müller [201]. Der Schweregrad der Degeneration steigt von Grad I nach Grad III an.

MRT basierte Klassifizierung der Bandscheibendegeneration:

Die MRT basierte Klassifizierung des Grades der Degeneration der Bandscheibe, die in der Gruppe der degenerativen Bandscheiben entsprechend den Empfehlungen von Pfirrmann et al. [166] Anwendung fand, ist in der nachstehenden Tabelle aufgeführt. (**Tabelle 4**).

Grad der Degeneration	Beschreibung des MRT- Befundes bei T2- gewichtetem Signal midsagittaler Schnitte
I	Homogene Diskusstruktur mit hellem weißen hyperintens Signal und normaler Bandscheibenhöhe
II	Inhomogenen Diskusstruktur mit weißem hyperintens Signal, klare Unterscheidung zwischen Nukleus und Anulus, normale Bandscheibenhöhe, mit oder ohne grauem horizontalen Signalband
III	Inhomogene Diskusstruktur, intermediäres graues Signalband, keine klare Unterscheidung zwischen Nukleus und Anulus, normale oder leicht verminderte Bandscheibenhöhe
IV	Inhomogene Diskusstruktur, hyperinteneses graues Signal, keine Unterscheidung zwischen Nukleus und Anulus möglich, normale bis verminderte Bandscheibenhöhe
V	Inhomogene Diskusstruktur, hypointenes schwarzes Signal, keine Unterscheidung zwischen Nukleus und Anulus möglich, kollabierter Bandscheibenraum

Tabelle 4: MRT-basierte Klassifikation der Degeneration der Bandscheibe nach Pfirrmann et al. [166]. Die Klassifikation wird anhand von T2- Sequenzen midsagittaler Schnitte deskriptiv vorgenommen. Der Schweregrad der Degeneration steigt von Grad I nach Grad V an.

7.1.3 Negative Kontrollgruppe: Gesunde Kontrollbandscheiben

In die negative Kontrollgruppe konnten drei Patienten eingeschlossen werden. Wichtig war es hier, Patienten zu finden, bei denen in der Bildgebung unauffällige Bandscheiben auf Grund von Erkrankungen des Wirbelkörpers aus operationstechnischen Gründen mit entfernt werden mussten. Vorbestehende Veränderungen der Bandscheiben wurden mittels Nativröntgen und MRT ausgeschlossen. Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Bandscheibenentnahme

betrug 46 ($\pm 1,7$; 44-47) Jahre bei einer Frau und zwei Männern. Die demographischen Daten, die Daten zur vorliegenden Grundkrankheit und zur erfolgten operativen Versorgung sind **Tabelle 5** zu entnehmen.

Nr	Alter	Geschl.	Diagnose	Begleit- erkrankungen	Begleit- verletzungen	OP
B 01	47	m	Chordom Os sacrum	Hypertonie, Diabetes mellitus	-	Sakrumresektion und Resektion der BS L5/S1
B 02	47	w	aggressiv wachsendes Hämangiom L3	-	-	Korporektomie L3, Resektion der BS L2/3 und L3/4
B 03	44	m	Degeneration L4/5 zur BS- Prothese	-	-	Partielle Korporektomie L4 und BS- Resektion L3/4 nach intraop. WK- Fraktur L4

Tabelle 5: Demographische Übersicht über die auf Grund von Erkrankungen des angrenzenden Wirbelkörpers operativ versorgten Patienten (n=3). Gezeigt werden neben den demographischen Daten die zur Operation führende Diagnose, die Lokalisation des erkrankten Segmentes, Begleiterkrankungen und die Art der operativen Versorgung.

7.2 Ethikvotum und Aufklärung

Das positive Votum der zuständigen Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin liegt unter dem Aktenzeichen 226-21 vor, und die Studie ist zur Durchführung in der vorliegenden Form genehmigt worden. Die Aufklärung der Patienten erfolgte zusätzlich zur üblichen Aufklärung über die geplante Operation mit einem speziellen Informationsblatt, einem Aufklärungsbogen und einem Gespräch. Dabei wurde die geplante Verwendung der ohnehin zu entnehmenden Bandscheibe zu Forschungszwecken in pseudonymisierter Form angesprochen und erklärt. Bei einem Einverständnis der Patienten wurden sie in die Studie eingeschlossen. Sowohl das Informationsblatt als auch der Aufklärungsbogen wurden von der Ethikkommission zusammen mit dem Ethikantrag unter dem Aktenzeichen 226-21 bewilligt. Das Informationsblatt und der Aufklärungsbogen sind als **Anlage1** (Informationsblatt) und als **Anlage2** (Aufklärungsbogen) der Arbeit beigelegt.

7.3 Probengewinnung- und verarbeitung

Humane Gewebe-Proben wurden frisch aus den extrahierten Bandscheiben gewonnen. Sie wurden am OP-Tisch unter sterilen Kautelen und RNase freien Bedingungen in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Anschließend wurde ein Teil auf flüssigem Stickstoff gefroren, ein Teil in Formalin-Lösung eingelegt und ein Teil in RNA- Pufferlösung („RNA-Later“, Qiagen, Hilden, Deutschland) eingebracht. Die auf flüssigem Stickstoff gefrorenen und die in RNA- Pufferlösung eingebrachten Proben wurden direkt ins Labor transferiert und dort bei -80°C bis zur Analyse gelagert. Die in Formalin eingebrachten Proben wurden nach 24 Stunden im Labor in Paraffin gebettet.

7.3.1 Kryoschnitte

Die im Operationsaal entnommenen Gewebeproben wurden in flüssigem Stickstoff ins Labor transferiert und dort in Tissue-Tec (Sakura Finetec, Torrance, USA) eingebettet. Von allen in Gewebeproben wurden $8\mu\text{m}$ dicke Schnitte am Cryostat (Microm HM500) angefertigt und auf oberflächenbearbeitete Objektträger (superfrost-plus Objektträger, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht. Die Kryoschnitte wurden anschließend bei -80°C gelagert. Die Kryoschnitte wurden vor der eigentlichen Untersuchung aufgetaut und 2-5 min. in Aqua dest. equilibriert.

7.3.2 Paraffinschnitte

Die im Operationsaal gewonnenen Gewebeproben wurden in Formalin fixiert und nach 24 Stunden in Paraffin gebettet. Dazu erfolgte eine Dehydratation des Gewebes mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe und eine Verdrängung des Alkohols mit einer Xylolbehandlung. Anschliessend wird der Gewebekblock in Paraffin eingegossen. Vom fertigen Paraffinblock wurden 2-4 μm dicke Schnitte mit dem Mikrotom geschnitten und in warmem Wasser auf Objektträger gebracht. Dann wurden die Schnitte im Wärmeschrank bei 37°C getrocknet und gelagert.

7.4 Gewebetypisierung

Der erste Schritt der Untersuchung bestand in einer Analyse der Gewebe. Es wurden Hämatoxylin-Färbungen an Paraffinschnitten durchgeführt, um die typischen histoanatomischen Strukturen darstellen zu können. Zum Übersichtsnachweis von Kollagen erfolgte die Färbung nach Masson-Goldner. Um die spezifischen Kollagene der Bandscheibe (Kollagen Typ- I und Kollagen Typ- II) nachweisen zu können, wurden immunhistochemische Färbungen an Kryoschnitten durchgeführt.

7.4.1 Hämatoxylin- und Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Mit der Hämatoxylin-(H)-Färbung und der Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung wurden standardisierte Übersichtsfärbungen zur morphologischen Beurteilung des Gewebes an Paraffinschnitten und an Kryoschnitten durchgeführt. Das Ziel ist die Darstellung der Gewebestrukturen durch den Kernfarbstoff Hämatoxylin und bei Notwendigkeit die nachfolgende Kontrastierung durch den negativ geladenen Plasmafarbstoff Eosin. Das Hämatein, der eigentliche Farbstoff, entsteht durch die Oxydation von Hämatoxylin.

Bei Paraffinschnitten wurde vor der Durchführung der eigentlichen Färbung das Paraffin entfernt. Nach zweimaliger Inkubation mit Xylol über 10 Minuten wurde der Schnitt durch eine absteigende Alkoholreihe mit anschließender Spülung in Aqua dest. wieder in ein wässriges Milieu überführt. Dann erfolgten die eigentliche Färbung mit Hämatoxylin und das Nachbläuen durch Anheben des pH-Wertes und Spülung in Wasser, bei der HE-Färbung gefolgt von der Zytoplasmafärbung mit Eosin, jeweils mit zwischenzeitlichem Auswaschen mittels Aqua dest. Die Dehydrierung des Paraffinschnittes erfolgte mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe und die Eindeckelung wurde nach dem Xylolschritt durchgeführt.

7.4.2 Färbung nach Masson-Goldner

Die Kryoschnitte wurden vor der eigentlichen Untersuchung aufgetaut und 2-5 min. in Aqua dest. equilibriert. Im ersten Schritt erfolgte dann für 2 min. eine Kernfärbung mit Eisenhämatoxylin-Lösung nach Weigert. Dabei wurde die Lösung A aus 1 g Hämatoxylin (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 100 ml 96%-igem Ethanol (J.T.Baker, Deventer, Niederlande) mit der Lösung B aus 1,16 g Eisen(III)-Chlorid (Fluka Riedel de Häen, Seelze, Deutschland) in 98 ml Aqua dest. und 4 ml 1N HCL (Merck) 1:1 gemischt. Danach erfolgte die Fixierung des Farbstoffes durch Spülung mit Leitungswasser für mindestens 10 min. gefolgt von einer 10 minütigen Färbung mit Säurefuchsin-Ponceau, bestehend aus 0,2 g Ponceau de Xylidine (Fluka Riedel de Häen) und 0,1 g Säurefuchsin (Merck) in 300 ml Aqua dest. und 0,6 ml Eisessig (Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Zur Fixierung des Farbstoffes wurden die Schnitte in 1%iger Essigsäure gespült. Zur Verbesserung der Farbhafung und Differenzierung schloß sich für 1 min. die Färbung mit Phosphormolibdänsäure-Orange G-Lösung an. Diese bestand aus 4 g Phosphormolibdänsäure (Fluka Riedel de Häen) und 2 g Orange G (Sigma-Aldrich St- Louis, USA) in 100 ml Aqua dest. Gefolgt von dreimaligem Spülen mit 1%-igem Eisessig für jeweils 2 min. Abschließend wurden die kollagenen Bindegewebsfasern für 5 min in Lichtgrün-Lösung, bestehend aus 0,15 g Lichtgrün (Merck) in 100 ml Aqua dest. und 0,2 ml Eisessig gefärbt und 5 min. mit 1%-iger Eissäure gespült. Alle Kryoschnitte wurden dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96% und 100%-igem Ethanol für jeweils 3 min. und 100%-igem Xylol (J.T.Baker) für 5 min.) entwässert. Die Konservierung erfolgte mit Entellan (Merck). Die Beurteilung der Färbungen erfolgte am Olympus BX41 Mikroskop und die Dokumentation mittels Olympus DP-Software Version 3.2.

7.4.3 Immunhistochemische Kollagentypisierung

Die immunhistochemischen Untersuchungen auf Kollagen Typ-I und Kollagen Typ-II wurden an Kryoschnitten zur Darstellung der dominierenden Kollagene der Bandscheibe durchgeführt. Dabei wurde Kollagen Typ-I als Hauptbestandteil des Anulus fibrosus und Kollagen Typ-II als Hauptbestandteilunter des Nucleus pulposus gefärbt. Genutzt wurde die Biotin/Avidin/Peroxidase-Technik (ABC Vectastain Elite Kit, Vector, Burlingame, USA), welche mit Diaminbenzozidien als Chromogen durchgeführt wurde. Die eingesetzten primären monoklonalen Antikörper gegen Kollagen-I und Kollagen-II sind kommerziell erhältlich; die Herkunftsdaten und verwendeten Verdünnungen sind Table 6 zu entnehmen. Das detaillierte Protokoll der immunhistochemischen Färbungen ist unter 7.5.1 aufgeführt.

7.5 Analyse der posttraumatischen Entzündungsreaktion

Um die Chemotaxis von Immun- und Entzündungszellen zu untersuchen, wurde das Gewebe immunhistochemisch auf T- Lymphozyten, neutrophile Granulozyten und Makrophagen gefärbt.

Es wurde das Gewebe mittels spezifischer Antikörper auf CD3- positive T- Lymphozyten und auf zytotoxische Perforin- positive T- Lymphozyten hin untersucht [74,98].

Die Bestimmung neutrophiler Granulozyten erfolgte mittels der immunhistochemischen Färbung des Markers Chloracetatesterase und Zellen aus der Monozyten/Makrophagenlinie wurden mittels des Markers PGM-1 (CD-68 positive Makrophagen) und des spezifischeren Markers Ber-Mac3 (CD-163 positive Makrophagen) vorgenommen. Letzterer erlaubt eine spezifische Anfärbung aktivierter Monozyten und Makrophagen [18,53,74,98,176,219].

Weiterhin wurde eine Untersuchung auf gewebeständige Bestandteile der Komplementkaskade durchgeführt, hierbei erfolgte die immunhistochemische Untersuchung auf C3 mittels Färbung des stabilen C3- Fragmentes C3c und C5b als gewebeständigen Bestandteilen der Komplementaktivierung sowie auf das aktive Endprodukt der Komplementkaskade MAC/ C5b-9 [63,189].

Die immunhistochemischen Untersuchungen auf Entzündungszellen wurden an Paraffinschnitten unter Nutzung der Alkalische Phosphatase anti-Alkalische Phosphatase Methode (APAAP) mit Fast Red als Chromogen durchgeführt.

Die immunhistochemischen Untersuchungen auf Bestandteile der Komplementkaskade wurde an Kryoschnitten unter Nutzung der Biotin/Avidin/Peroxidase-Technik (ABC Vectastain Elite Kit, Vector, Burlingame, USA) mit Diaminbenzozidien als Chromogen durchgeführt.

Die eingesetzten primären monoklonalen Antikörper sind kommerziell erhältlich; die Herkunftsdaten und verwendeten Verdünnungen sind [Tabelle 6](#) zu entnehmen.

Färbung	Primärer Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Sekundärer Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Kollagen I	mouse anti-human Collagen I	Chemicon	1:5000	anti-mouse IgG	Vector	1:100
Kollagen II	mouse anti-human Collagen II	Chemicon	1:100	anti-mouse IgG	Vector	1:100
C3c	monoclonal mouse anti-human C3c complement	Dako Cytomation	1:5	anti-mouse IgG	Vector	1:100
C5b	monoclonal mouse anti-human C5b complement	Dako Cytomation	1:100	anti-mouse IgG	Vector	1:100
C5b-9	monoclonal mouse anti-human C5b-9	Dako Cytomation	1:25	anti-mouse IgG	Vector	1:100
Napthol AS-D Chloroazetat-Esterase	Immunhistochemischer Kit	Sigma-Aldrich				
CD 68	mouse-anti human Klon PG-M1	Dako Cytomation	1:50	anti-mouse IgG	Dako Cytomation	1:100
CD 163	mouse anti-human Klon 10D6	Vision BioSystems	1:100	anti-mouse IgG	Dako Cytomation	1:100
Perforin	rat anti-human Klon PI-8	Hölzel	1:500	mouse-anti rat IgG	Dako Cytomation	1:100
CD 95	mouse anti human Klon B-10	Santa Cruz	1:100	anti-mouse IgG	Dako Cytomation	1:100
Bcl-2	mouse anti human Klon 124	Dako Cytomation	1:50	anti-mouse IgG	Dako Cytomation	1:100

Tabelle 6: Übersicht über die eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper, ihre Herkunft und die eingesetzten Verdünnungen.

7.5.1 Immunhistochemische Färbung der Kryoschnitte

Nachfolgend wird das verwendete Standardprotokoll dargestellt, bei dem entsprechend des jeweiligen Primärantikörpers die entsprechenden sekundären Antikörper (Tabelle 6) eingesetzt wurden. Die Inkubation aller verwendeten Substanzen erfolgt bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Die getrockneten Schnitte wurden zuerst in -20°C kaltem Aceton für 10 min. fixiert und anschließend 30 min. bei Raumtemperatur gelagert. Das Gewebe wurde mit einem Dako-Pen (DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland) eng umrandet um eine hydrophobe Barriere zu erzeugen. Nach einer Einwirkzeit von 1 min. wurden die Schnitte für 5 min. in Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS, Biochrom, Berlin, Deutschland) equilibriert. Danach erfolgte zunächst die 30 minütige Blockierung der endogenen Peroxydase mit 0,3%-igem Wasserstoffperoxid (Fluka Riedel de Häen) in Methanol (J.T.Baker), gefolgt von 5 minütigem Waschen der Schnitte in PBS. Darauf folgte eine 20 minütige Blockung mit Vectastain Normal Serum (Vector, Burlingame, USA; 1:100 verdünnt in PBS/FCS-Lösung (fötales Kälber Serum; Biochrom)) entsprechend des primären Antikörpers. Das Serum wurde anschließend abgekippt und der primäre Antikörper in der titrierten Verdünnung eine Stunde inkubiert. Nach 5 minütigem Spülen der Schnitte mit PBS folgte die Inkubation mit dem sekundären biotynilierten speziesabhängigen Antikörper (1:100 in PBS/FCS-Lösung verdünnt) für 30 min., gefolgt von erneutem Spülen in PBS. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Vectastain Elite ABC Reagenz (ABC Vectastain Elite Kit, Vector, Burlingame, CA) für 30 min. zur Bildung des Biotin-Avidin-Komplexes am sekundären Antikörper. Nach erneutem Spülen mit PBS erfolgte die Zugabe des Chromogens DAB (3'-Diaminobenzidine) aus dem Vectastain DAB Substrat Kit (Vector). Abschließend wurden die Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und in Entellan (Merck) konserviert. Bei der Färbung des MAC/C5b-9 wurde eine Hämatoxylin-Gegenfärbung für eine verstärkte Kontrastierung zur Verbesserung der Aussagefähigkeit durchgeführt. Diese erfolgte mit Hämatoxylin nach Mayer (Merck). Für die standardisiert bei jeder Untersuchung durchgeführte Negativkontrolle wurde der spezifische Antikörper weggelassen. Damit konnte die fehlende Anfärbbarkeit nachgewiesen werden. Als positive Kontrolle wurde die

Darstellbarkeit des hämatopoetischen Knochenmarks genutzt, um die Expression der untersuchten Antigene nachzuweisen. Die Beurteilung wurde am Olympus BX41 Mikroskop vorgenommen, die Dokumentation erfolgte mit Olympus DP-Software Version 3.2.

7.5.2 Immunhistochemische Färbung der Paraffinschnitte

Die Paraffinschnitte wurden vor der Inkubation mit dem primären Antikörper 2 Minuten in einem Citratpuffer erhitzt, um Epitope freizulegen, die durch die Vorbehandlung mit Formalin verändert worden sind. Anschliessend erfolgte eine Inkubation von 45 Minuten Dauer mit dem primären Antikörper. Das Präparat wurde jetzt intensiv mit 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Tris)-Puffer gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen und anschliessend mit dem Brückenantikörper für 30 Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte eine Überschichtung mit dem APAAP-Komplex. Die beiden letzten Arbeitsschritte wurden einmal wiederholt, um eine intensivere Färbung zu erreichen. Für die Entwicklung wurde nun Fast Red, das Substrat der alkalischen Phosphatase, hinzugegeben. Das Spaltprodukt ergab einen roten Niederschlag. Zur besseren Visualisierung der Kerne wurde mit Hämalaun unter fliessendem Wasser gegengefärbt. Abschliessend wurden die Schnitte mit Kaisers Glycerin-Gelatine eingedeckelt. Für die standardisiert bei jeder Untersuchung durchgeführte Negativkontrolle wurde der spezifische Antikörper weggelassen. Damit konnte die fehlende Anfärbbarkeit nachgewiesen werden. Als positive Kontrolle wurde die Darstellbarkeit des hämatopoetischen Knochenmarks genutzt, um die Expression der untersuchten Antigene nachzuweisen.

7.6 Analyse der Apoptose

Das Vorhandensein von Apoptose wurde mittels der histochemischen Analyse der Bandscheiben durch die standardisierte „terminal desoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling“ (TUNEL) Technik analysiert. Die Gegenfärbung zur Erfassung aller Zellkerne, sowohl der lebender als auch der apoptotischer Zellen erfolgte mittels der 4',6-Diamidino-2-phenylindol „DAPI“-Färbung.

Um zu zeigen, dass es sich hierbei auch um Apoptose ortständiger intradiskaler Zellen handelt, wurden in HE- Schnitten ortsständige intradiskale Zellen mit für die Apoptose typischen histomorphologischen Veränderungen gezeigt.

Weiterhin wurde die Aktivität von Apoptose vermittelnden Caspasen gemessen. Dazu gehörten die Aktivität der Initiator-Caspasen-8- und 9 als jeweils relevante Caspasen des extrinsischen (Caspase 8) und des intrinsischen (Caspase 9) Aktivierungsweges und der Effektor-Caspasen 3 und 7.

Zur weiteren Analyse der Initiierung der Aktivierungswege wurde die Expression von Rezeptoren der TNF-Familie und ihre Liganden für den extrinsischen Weg und das Verhältnis des pro-apoptotischen Bax zum anti-apoptotischen Bcl-2 für den intrinsischen Weg auf RNA- Ebene gemessen.

Um zu zeigen, dass diese Ergebnisse sich auch in der Syntheseleistung der Zellen widerspiegeln, wurden immunhistochemische Färbungen an Paraffinschnitten auf die analysierten Rezeptoren und das antiapoptotische Bcl-2 durchgeführt.

7.6.1 Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling (TUNEL) und DAPI- Gegenfärbung

Kryoschnitte wurden mit der TUNEL- Fluoreszenz- Färbung mit dem Kit (DeathEnd Fluorometric Tunel System, Promega, Mannheim, Deutschland) analysiert. Bei dieser Färbemethode verbindet die terminale rekombinante Desoxynucleotid-Transferase (rTdT) die 3'OH-Enden der DNA- Fragmente mit Fluorescein-12-dUTP. Auf Grund der Fluoreszenz dieses Nukleotids kann die Fragmentation im

Floureszenzmikroskop gezeigt werden. Für die Negativkontrolle wurde das rTdT-Enzym bei der Analyse weggelassen. Die zusätzliche DAPI- Färbung erfolgte als Übersichtsfärbung zur Darstellung aller Zellkerne. Da dieser Floureszenzmarker durch die Zellmembran hindurchwandern kann, ist er nicht nur zur DNA- Markierung apoptotischer, sondern auch lebender Zellen geeignet. DAPI bildet mit der DNA stark floureszierende Komplexe.

Standardprotokoll für die TUNEL- Färbung und DAPI-Gegenfärbung

Das in flüssigem Stickstoff schockgefrorene und dann bei -80°C gelagerte Gewebe wurden in $6\mu\text{m}$ dicke Schnitte geschnitten, welche auf oberflächenbearbeitete Objektträger (super-frosted-slides, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht wurden. Danach wurden die Schnitte für 5 Minuten in 0,85% NaCl und für weitere 5 Minuten in PBS gewaschen. Die Fixation der Schnitte erfolgte in 10%igem gepufferten Formalin für 15 Minuten bei Raumtemperatur, dann Spülen in PBS.

Der TUNEL Assay wurde unter Verwendung des KIT DeathEnd Fluorometric Tunel System (Promega, Mannheim, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers mit einem zusätzlichen Schritt durchgeführt. Bei diesem zusätzlichen Arbeitsschritt wurde das Gewebe für 10 min mit 0,3%igem H_2O_2 inkubiert, um den Hintergrund zu reduzieren, der auf Grund der Aktivität zellulärer Enzyme verursacht wird.

Zusätzlich zur TUNEL-Färbung wurden die Gewebeschnitte mit Vectashield Mounting Medium, welches DAPI enthält, eingedeckelt.

Die Gewebeschnitte wurden mit dem Floureszenzmikroskop (Axioskop 40, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) analysiert und mit der Digitalkamera (Olympus C-4000) fotografiert.

7.6.2 Flourometrische Bestimmung der Caspaseaktivität

Zur Bestimmung der Caspaseaktivität wurden die Gewebeproben lysiert und die Protein-Konzentration mittels des Roth Nanoquant Protein Assay bestimmt. Die Aktivität der zentralen Effektor-Caspasen 3/7, sowie der Initiator-Caspase 8 als Indikator für den extrinsischen und der Initiator-Caspase 9 als Indikator für den intrinsischen Weg der Aktivierung der Apoptosekaskade wurden mittels flourometrischer Assays bestimmt. Dabei werden durch die Enzyme Stoffwechselhomologe gespalten, welche dann die zu messende Reaktion mit dem Floureszenzfarbstoff vermitteln. Alle Assays nutzen ein proluminiszendes Caspasesubstrat und eine thermostabile Luziferase in einem Puffer-System. Durch die Caspase bedingte Spaltung des Substrates kommt es zur Freisetzung von Aminoluziferin, welches zusammen mit der Luziferase ein luminiszierendes Signal generiert. Die Luminiszenz ist direkt proportional zur Caspaseaktivität. Die Messung der Aktivität der Caspasen erfolgte in „relative light units“ (RLU).

Standardprotokoll für die Protein-Isolierung und die flourometrische Messung der Caspaseaktivität

Gewebeproben wurden aufgetaut und in kleinen Fragmenten in ein steriles Gefäß überführt, die gesamte Aufarbeitung fand auf Eis statt. Das Gewebe wurde mit 1-2ml kaltem Lysepuffer bedeckt (25mM Hepes (ph 7,5), 0,1% Triton –X-100, 5 mM MgCl₂, 5mM DTT, frischer Protease Inhibitor Cocktail und EDTA (Complete Mini und EDTA; (Roche; Mannheim, Deutschland), 1 mM EGTA) und homogenisiert. Das Homogenisat wurde auf 2 ml Eppendorf Safe-Lock-Tubes (Eppendorf, Deutschland) zu gleichen Volumenanteilen verteilt. Dann wurden die Proben in einer Kühlzentrifuge bei 4°C und bei 50.000g für 10 Minuten zentrifugiert, die wässrige Phase abgenommen und von mehreren Ansätzen gepoolt. Die gepoolten Ansätze von einer Probe wurden gut gemischt und aliquoutiert (mindestens drei Aliquouts). Für den durchzuführenden Caspaseassay wurden die Proben vor der Durchführung der Tests auf eine Proteinkonzentration von 300 µg/ml gebracht.

Caspase 3/7

Für die Bestimmung der aktiven Caspasen 3 und 7 wurde das KIT Apo-ONE Homogeneous Caspase 3/7 Assay verwendet. Die Proteinisolierung und Aufbereitung in der Protinkonzentration von 300 µg/ml erfolgte entsprechend dem Standardprotokoll. Davon wurden 100 µl in 96-Well Platten pipettiert. Nach einer lichtgeschützten Inkubationszeit von 30 min auf einem Schüttler wurde die Aktivität der Caspasen durch die Messung der Luminiszenz bei einer Wellenlänge von 490 nm in dem ELISA-Lesegerät (GENios, Tecan) gemessen.

Caspase 8

Für die Bestimmung der aktiven Caspase 8 wurde das KIT Caspase-Glo 8 (Promega, Mannheim, Deutschland) verwendet. Die Proteinisolierung und Aufbereitung in der Protinkonzentration von 300 µg/ml erfolgte entsprechend dem Standardprotokoll. Davon wurden 100 µl in 96-Well Platten pipettiert. Nach einer lichtgeschützten Inkubationszeit von 30 min auf einem Schüttler wurde die Aktivität der Caspase durch die Messung der Luminiszenz bei einer Wellenlänge von 490 nm in dem ELISA-Lesegerät (GENios, Tecan) gemessen.

Caspase 9

Für die Bestimmung der aktiven Caspase 9 wurde das KIT Caspase-Glo 9 (Promega, Mannheim, Deutschland) verwendet. Die Proteinisolierung und Aufbereitung in der Protinkonzentration von 300 µg/ml erfolgte entsprechend dem Standardprotokoll. Davon wurden 100 µl in 96-Well Platten pipettiert. Nach einer lichtgeschützten Inkubationszeit von 30 min auf einem Schüttler wurde die Aktivität der Caspase durch die Messung der Luminiszenz bei einer Wellenlänge von 490 nm in dem ELISA-Lesegerät (GENios, Tecan) gemessen.

7.6.3 Real time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) zur Bestimmung pro- und antiapoptotischer Mediatoren

Die Expression von pro- und antiapoptotischen Komponenten des extrinsischen und des intrinsischen Weges der Apoptosekaskade im traumatisierten Bandscheibengewebe wurde mittels Bestimmung der mRNA analysiert. Dazu wurde die Expression des TNF-Rezeptors1 und des Fas-Rezeptors als Mitglieder der TNF-Rezeptorgruppe und ihre Liganden FasL und TNF α als Vermittler des extrinsischen Weges der Apoptosekaskade bestimmt. Für die Beurteilung der Rolle des intrinsischen Weges wurden die Expression des anti-apoptotischen Bcl-2 und des pro-apoptotische Bax gemessen. Für eine semiquantitative Bestimmung wurde die Gen- Expression mittels RT-PCR über die entsprechende Amplifizierung der zu analysierenden DNA-Sequenzen in homogenisierten Gewebeproben gemessen. Es wurde der relative Expressionslevel „relative expression level“ (REL) im Vergleich zum β -Aktin housekeeping Gen als Referenz gemessen.

Protokoll für die RNA- Isolation und RT- PCR

Das in RNase freiem Puffer (RNALater) bei -80°C gelagerte Bandscheibengewebe wurde homogenisiert in Quiazol (Qiagen, Hilden, Deutschland) und die gesamte RNA entsprechend dem Protokoll des Herstellers des Lipid-Tissue-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Die Quantität und die Qualität der RNA wurden mittels des RNA 6000 Nano Assay von Agilent Technologies (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) bestimmt. 500 ng der totalen RNA-Menge wurden bei 70°C über 10 Minuten mit der Beigabe des Oligoprimer (pd(T)12-18, Amersham, Deutschland) denaturiert. Dabei erfolgte die inverse Transkription in die komplementäre DNA (cDNA) unter Nutzung von 20 μl MMLV-RT (Invitrogen, Deutschland) zusammen mit FSB-Puffer (Invitrogen, Deutschland), 0,5mmol/l Deoxyribonukleotid Triphosphatase (dNTPS), 10 mmol/l Dithiothreitol (DTT) und RNAsin (Promega, Mannheim, Deutschland) bei 25°C für 10 Minuten, gefolgt von 42°C für 50 Minuten. Anschließend wurde 1 μl Aliquot der resultierenden cDNA mittels der RT-PCR in einer Mischung aus 25 μl mit dem Quantitec Probe RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) amplifiziert. Primer Paare zur Detektion von FasR und FasL, TNFR1 und TNF α sowie Bax und Bcl-2 sind von Quantitec Primers

(Qiagen, Hilden, Deutschland) erhältlich. Das Primer Paar des β -Actin housekeeping Gens wurde als Referenz verwendet (Quantitec Primers, Qiagen, Hilden, Deutschland). Der Assay wurde in einem Opticon 1-Real-Time-Cycler von MJ-Research (BioRad, München, Deutschland) durchgeführt. Folgende Bedingungen wurden für die Amplifizierung gewählt: fünf Minuten bei 94°C, 45 Zyklen a 30 Sekunden bei 94°C, 30 Sekunden bei 56°C und 30 Sekunden bei 72°C; folgend den Empfehlungen des Herstellers.

7.6.4 Immunhistochemische Färbung apoptoserelevanter Proteine

Paraffingebettetes Gewebe der drei Untersuchungsgruppen wurde auf den Mediator Bcl-2 des intrinsischen Apoptoseweges und auf den Fas- Rezeptor als Bestandteil der extrinsischen Apoptoseaktivierung immunhistochemisch mittels spezifischer Antikörper gefärbt und diese Färbungen zwischen den Gruppen deskriptiv verglichen. Weiterhin wurde die Übereinstimmung der Ergebnisse der Färbungen mit den Ergebnissen der mRNA-Analyse dieser Faktoren überprüft.

7.7 Daten- Analyse

Alle erhobenen Daten wurden in einer Excel- Datenbank archiviert. Die Proben der Patienten wurden alphanumerisch registriert, um eine pseudonymisierte Behandlung der Daten zu garantieren. Die erforderlichen statistischen Analysen wurden mit Hilfe der kommerziell verfügbaren Software „SPSS for Windows®“ durchgeführt. Die Auswertung statistischer Signifikanzen bei der Bestimmung der Aktivität der Caspasen und der Expression der pro- und anti-apoptotischen Mediatoren der Apoptose erfolgte mittels des Student`s t- Test. Signifikanz wurde bei einem $p < 0.05$ definiert.

8. Ergebnisse

8.1 Gewebedifferenzierung

8.1.1 Hämatoxylin-Färbung

Zur histoanatomischen Darstellung des untersuchten Bandscheibengewebes wurden Hämatoxylin- Kryoschnitte von Bandscheiben aller drei Untersuchungsgruppen angefertigt und lichtmikroskopisch auf die typischen Strukturen der Bandscheibe hin analysiert. In den Abbildungen **10a** bis **10c** sind exemplarisch Bandscheiben aus jeder der Untersuchungsgruppe abgebildet.

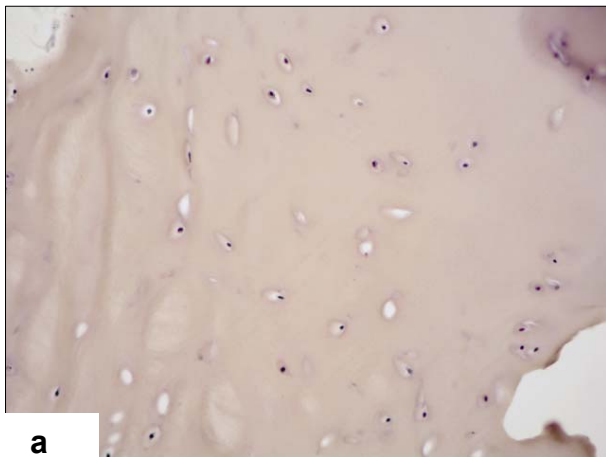


Abbildung10a:

Hämatoxylin-Färbung in 20-facher Vergrößerung zur Darstellung der typischen Strukturen der Bandscheibe: Anteile des Nucleus pulposus mit kollagener Matrix und typischen Chondrozyten in einer Bandscheibe der Kontrollgruppe.

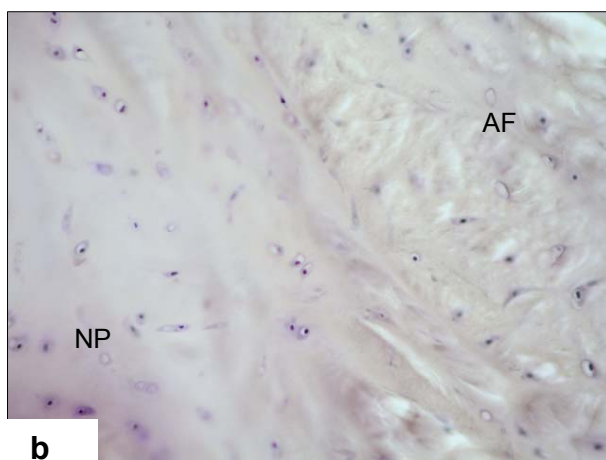
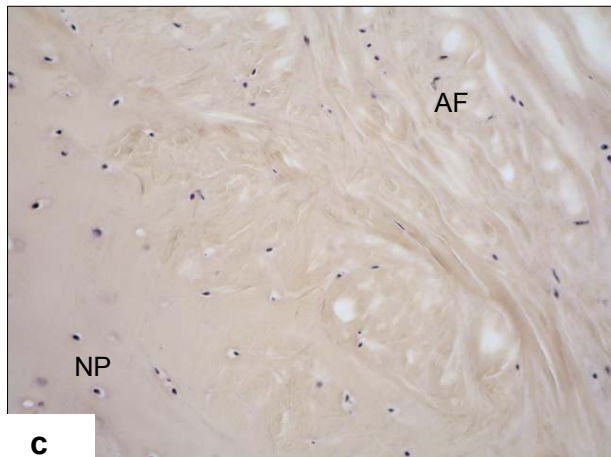


Abbildung10b:

Hämatoxylin-Färbung in 20-facher Vergrößerung zur Darstellung der typischen Strukturen der Bandscheibe: Darstellung des Nucleus pulposus (NP) mit beginnendem Übergang zum Anulus fibrosus (AF) in einer Bandscheibe der degenerativen Gruppe.

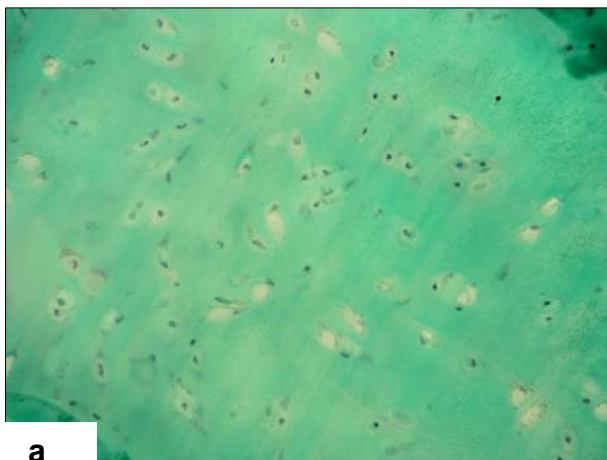
**Abbildung10c:**

Hämatoxylin-Färbung in 20-facher Vergrößerung zur Darstellung der typische Strukturen der Bandscheibe: Darstellung von Strukturen des Anulus fibrosus (AF) mit Übergang zum Nucleus pulposus (NP) bei einer Bandscheiben aus der Traumagruppe

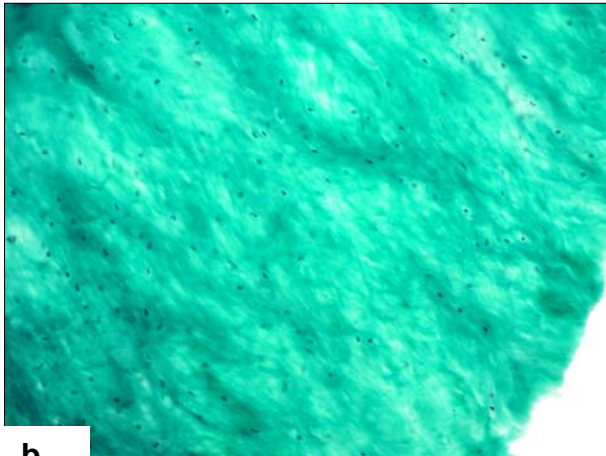
Die Hämatoxylinfärbungen zeigen in allen Untersuchungsgruppen die typischen histologischen Strukturen der Bandscheibe mit Anteilen des Nucleus pulposus und des Anulus fibrosus.

8.1.2 Färbung nach Masson-Goldner

Im Rahmen der Gewebedifferenzierung wurde von jeder entnommenen Bandscheibe standardisiert eine Übersichtsfärbung auf Kollagen nach Masson-Goldner durchgeführt. Dabei wurden die Strukturen lichtmikroskopisch beurteilt. In allen Proben konnte mittels dieser Methode Kollagen nachgewiesen werden. Die Abbildungen 11a bis 11c zeigen exemplarisch für alle untersuchten Gruppen den Nachweis von Kollagen.

**Abbildung11a:**

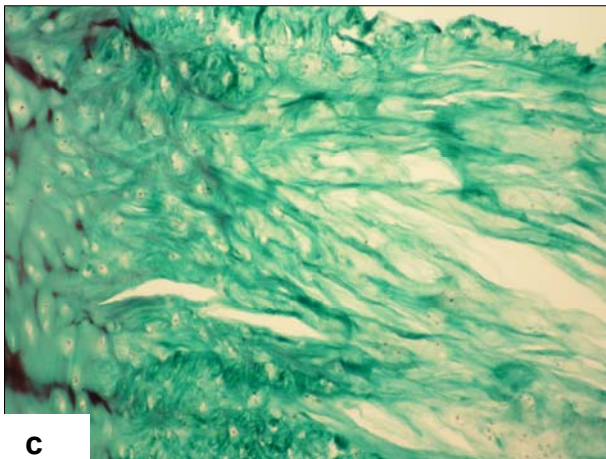
Masson- Goldner- Färbung in 20-facher Vergrößerung zur Darstellung der kollagenen Fasern in einer Bandscheibe der Kontrollgruppe. Dargestellt werden Anteile des Nucleus pulposus mit typischen Chondrozyten.



b

Abbildung 11b:

Masson- Goldner- Färbung in 20-facher Vergrößerung zur Darstellung der kollagenen Fasern in einer Bandscheibe aus der degenerativen Gruppe. Dargestellt werden Anteile des Anulus fibrosus mit seiner typischen Faserstruktur und „Fibrozyten ähnlichen“ Zellen.



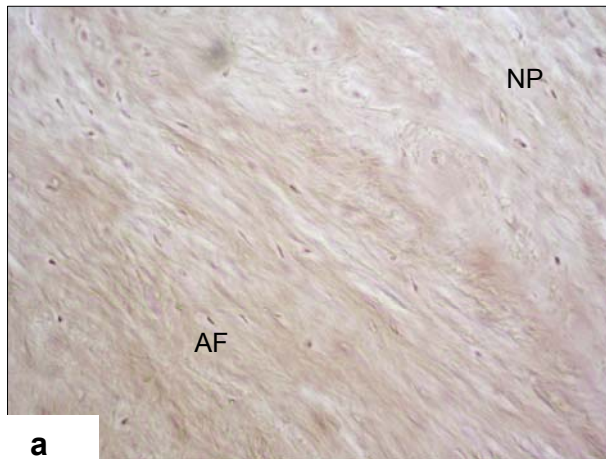
c

Abbildung 11a:

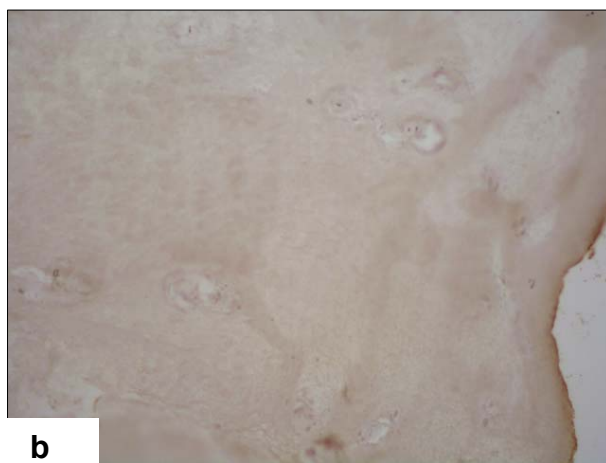
Masson- Goldner- Färbung in 20-facher Vergrößerung zur Darstellung der kollagenen Fasern in einer Bandscheibe der Traumgruppe. Dargestellt wird ein Anteil der verletzten Bandscheibe, der traumatisch zerstört war. Die Faserstruktur zeigt sich ungerichtet, kollagene Anteile sind jedoch in dieser Färbung nachweisbar

8.1.3 Immunhistochemische Färbung auf Kollagen-I und Kollagen-II

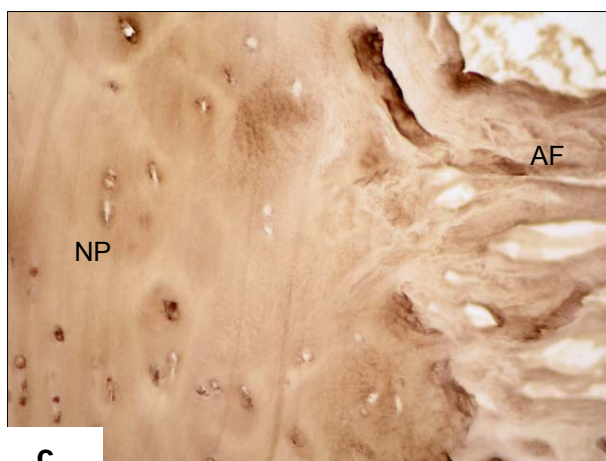
Zum detaillierteren Nachweis spezifischer Kollagene erfolgte die immunhistochemische Färbung aller Proben auf Kollagen-I und Kollagen-II als typischen und dominierenden Bestandteilen der extrazellulären Matrix der Bandscheibe. Hier konnte in allen Proben regelmäßig sowohl Kollagen-I als dominierendes Kollagen des Anulus fibrosus als auch Kollagen-II als dominierendes Kollagen des Nucleus pulposus nachgewiesen werden. Die Abbildungen **12a** bis **12c** zeigen exemplarisch den Nachweis von Kollagen-I in den drei untersuchten Gruppen, während in den Abbildungen **13a** bis **13c** exemplarisch der Nachweis von Kollagen-II in allen untersuchten Gruppen gezeigt wird.

**Abbildung 12a:**

Immunhistochemische Färbung in 20-facher Vergrößerung zum Nachweis von Kollagen-I in einer Bandscheibe der Kontrollgruppe. Dargestellt werden Anteile des Anulus fibrosus mit einem Anschnitt der Übergangszone zum Nucleus pulposus.

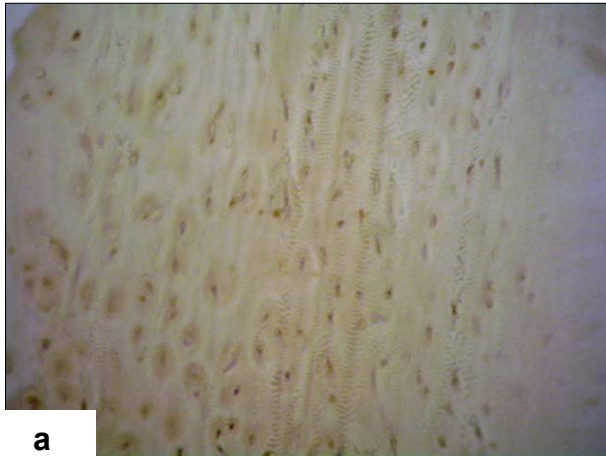
**Abbildung 12b:**

Immunhistochemische Färbung in 20-facher Vergrößerung zum Nachweis von Kollagen-I in einer Bandscheibe der degenerativen Gruppe. Gezeigt werden Anteile des in dieser Gruppe relativ zellarmen Nucleus pulposus gezeigt.

**Abbildung 12c:**

Immunhistochemische Färbung 20-facher Vergrößerung zum Nachweis von Kollagen-I in einer Bandscheibe der Traumagruppe. Gezeigt wird eine Übergangszone zwischen dem Nucleus pulposus (NP) und dem Anulus fibrosus (AF).

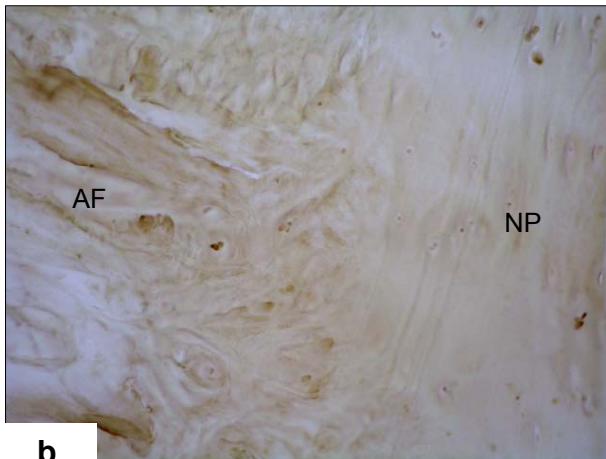
Die immunhistochemischen Färbungen auf Kollagen-I zeigen in allen untersuchten Bandscheibenpräparaten der drei Gruppen konsistent die Präsenz Kollagen-I.



a

Abbildung 13a:

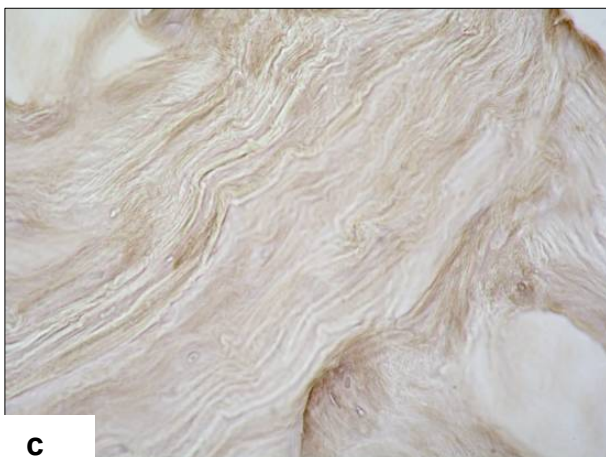
Immunhistochemische Färbung in 20-facher Vergrößerung zum Nachweis von Kollagen-II in einer Bandscheibe der Kontrollgruppe. Es zeigt sich besonders viel Kollagen-II in der Umgebung der Zellen.



b

Abbildung 13b:

Immunhistochemische Färbung in 20-facher Vergrößerung zum Nachweis von Kollagen-II in einer Bandscheibe der degenerativen Gruppe. Der Schnitt zeigt den Übergang zwischen dem Anulus fibrosus (AF) und dem Nucleus pulposus (NP).



c

Abbildung 13c:

Immunhistochemische Färbung in 20-facher Vergrößerung zum Nachweis von Kollagen-II in einer Bandscheibe aus der Traumagruppe. Gezeigt wird ein traumatisch zerstörter Anteil des Anulus fibrosus mit einer teilweisen Aufhebung der Strukturierung der Faserrichtung, der Kollagen-II-Gehalt bleibt nachweisbar.

Die immunhistochemischen Färbungen auf Kollagen-II zeigen in allen untersuchten Bandscheibenpräparaten der drei Gruppen konsistent die Präsenz Kollagen-II.

8.2 Posttraumatische Entzündungsreaktion

8.2.1 Entzündungszellen

Zur Analyse der posttraumatischen Entzündungsreaktion wurden verschiedene Entzündungszellen immunhistochemisch unter Verwendung der in der **Tabelle 6** aufgeführten spezifischen Antikörper auf Paraffinschnitten gefärbt und lichtmikroskopisch analysiert. Dazu gehören CD3 positive T-Lymphozyten, zytotoxische Perforin- positive T- Lymphozyten, neutrophile Granulozyten (CD66) mit Chloracetatesterase als Marker und Makrophagen (CD68 mit PG-M1 als Marker und CD163 mit Ber-Mac3 als Marker). In den Abbildungen **14a** bis **19c** werden jeweils exemplarisch Beispiele aus jeder der Gruppen gezeigt, die den in den verschiedenen Untersuchungsgruppen durchgängig erhobenen Befunden entsprechen.

CD3-positive T- Lymphozyten:

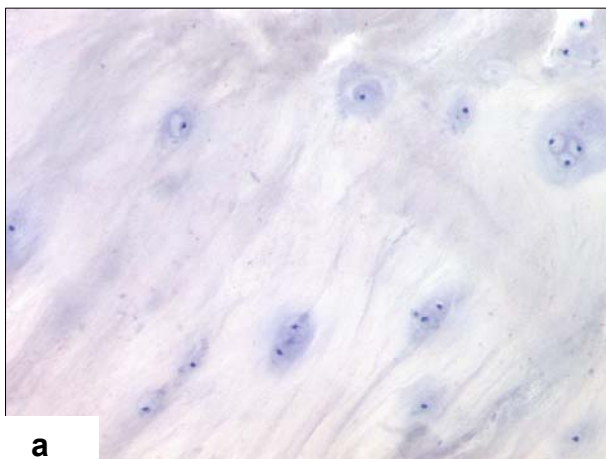
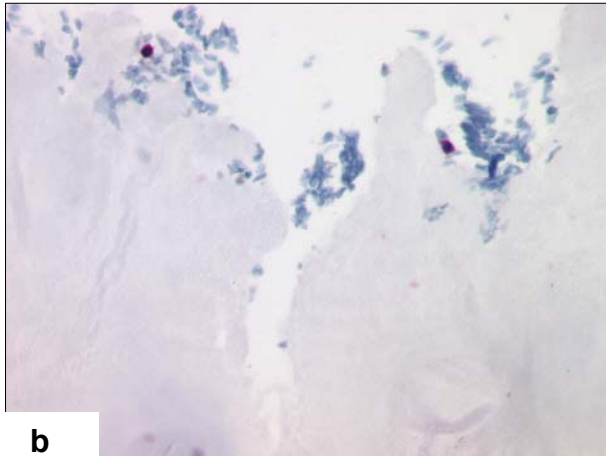


Abbildung 14a:

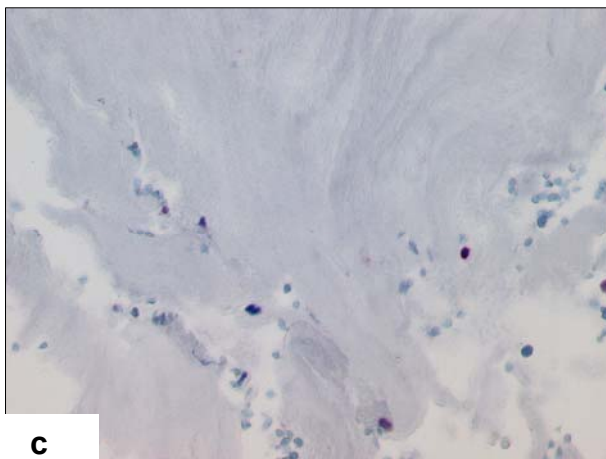
Immunhistochemische Färbung in 40-facher Vergrößerung zum Nachweis von CD3- positiven T-Lymphozyten in einer Bandscheibe der Kontrollgruppe. Es lassen sich in der Kontrollgruppe keine CD3-positiven Lymphozyten nachweisen.



b

Abbildung 14b:

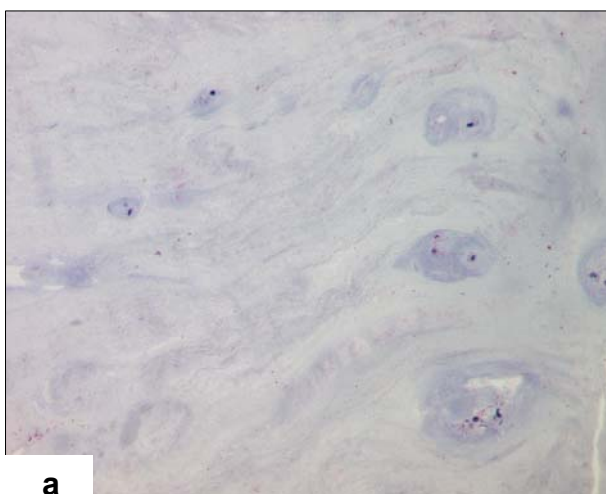
Immunhistochemische Färbung in 40-facher Vergrößerung zum Nachweis von CD3- positiven T-Lymphozyten in einer Bandscheibe der degenerativen Gruppe. Es lassen sich in der degenerativen Gruppe keine bis einige vereinzelte CD3- positive Lymphozyten, diese in Spalten des Gewebes, nachweisen.



c

Abbildung 14c:

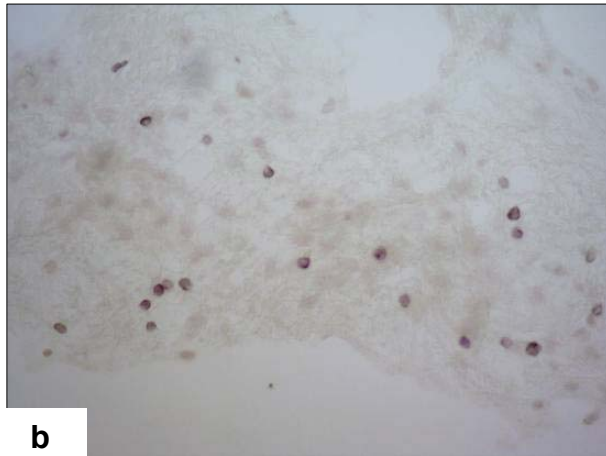
Immunhistochemische Färbung in 40-facher Vergrößerung zum Nachweis von CD3- positiven T-Lymphozyten in einer Bandscheibe der Traumagruppe. Es lassen sich in der Traumagruppe regelmässig CD3- positive Lymphozyten nachweisen, diese jedoch auch nur in geringer Zahl.

Perforin- positive zytotoxische T- Lymphozyten:

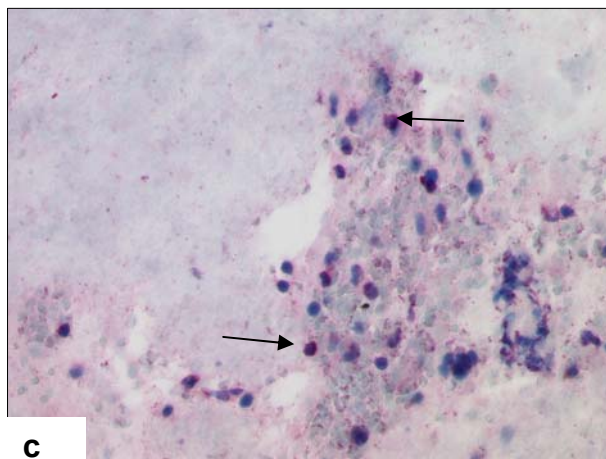
a

Abbildung 15a:

Immunhistochemische Färbung in 40-facher Vergrößerung zum Nachweis von Perforin- positiven zytotoxischen T- Lymphozyten in einer Bandscheibe der Kontrollgruppe. Es lassen sich in der Kontrollgruppe keine Perforin- positiven zytotoxischen Lymphozyten nachweisen.

**b****Abbildung 15b:**

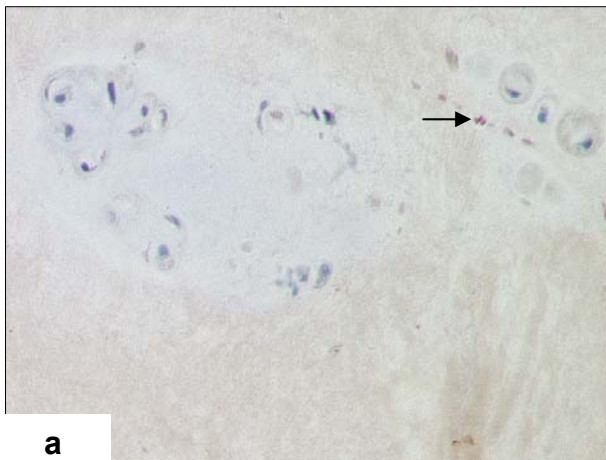
Immunhistochemische Färbung in 40-facher Vergrößerung zum Nachweis von Perforin-positiven zytotoxischen T-Lymphozyten in einer Bandscheibe der degenerativen Gruppe. Es lassen sich hier vereinzelt Perforin- positive zytotoxische Lymphozyten nachweisen.

**c****Abbildung 15c:**

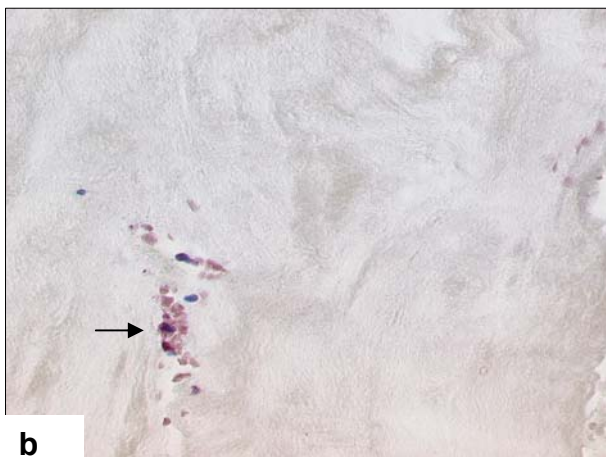
Immunhistochemische Färbung in 40-facher Vergrößerung zum Nachweis von Perforin-positiven zytotoxischen T-Lymphozyten in einer Bandscheibe der Traumagruppe. Es lassen sich in dieser Gruppe Perforin- positive zytotoxische Lymphozyten (Pfeil) nachweisen.

Die immunhistochemische Färbung auf CD3- positive T- Lymphozyten zeigt, dass in der Kontrollgruppe keine migrierenden Lymphozyten nachweisbar sind. In der degenerativen Gruppe lassen sich diese Zellen nicht oder nur vereinzelt, dann in Gewebedefekten, nachweisen. In der Traumagruppe sind die CD3- positiven T- Lymphozyten regelhaft, jedoch in geringer Anzahl, nachweisbar.

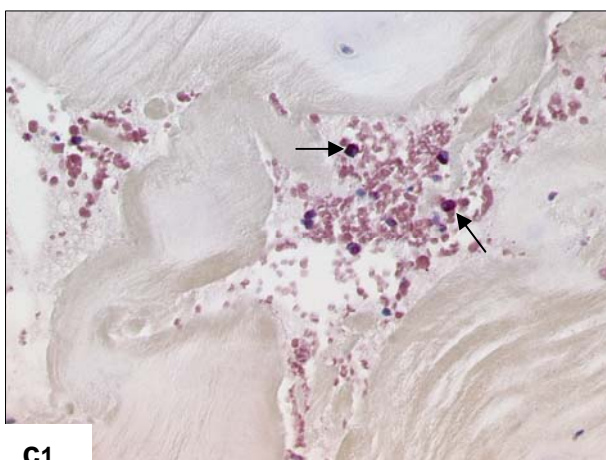
Die immunhistochemische Färbung auf Perforin- positive zytotoxische Lymphozyten zeigt, dass in der Kontrollgruppe keine Lymphozyten dieser Gruppe nachweisbar sind, während dieser Zelltyp in der degenerativen Gruppe vereinzelt und in der Traumagruppe regelhaft nachweisbar ist, wobei diese Zellen in den beiden letztgenannten Gruppen in Gewebespalten lokalisiert sind.

Neutrophile Granulozyten:**Abbildung 16a:**

Immunhistochemische Färbung in 40-facher Vergrößerung zum Nachweis von neutrophilen Granulozyten in einer Bandscheibe der Kontrollgruppe. Es lassen sich in dieser Gruppe keine oder vereinzelte neutrophile Granulozyten (Pfeil) nachweisen.

**Abbildung 16b:**

Immunhistochemische Färbung in 40-facher Vergrößerung zum Nachweis von neutrophilen Granulozyten in einer Bandscheibe der degenerativen Gruppe. Es lassen sich neutrophile Granulozyten (Pfeil) in dieser Gruppe nachweisen.

**Abbildung 16c1:**

Immunhistochemische Färbung in 40-facher Vergrößerung zum Nachweis von neutrophilen Granulozyten in einer Bandscheibe der Traumagruppe. Es lassen sich reichlich neutrophile Granulozyten (Pfeile) in traumabedingten Defekten der Bandscheibe nachweisen.

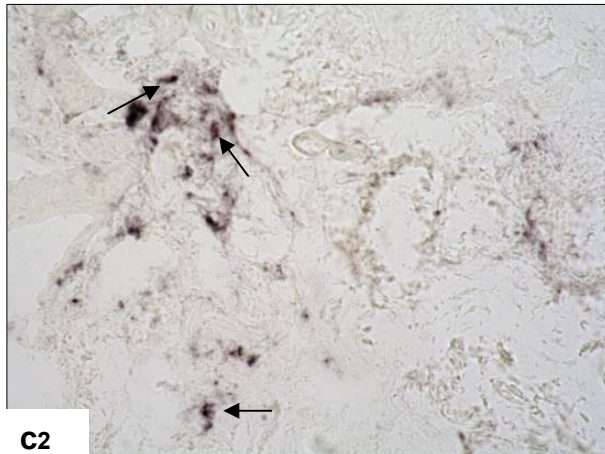


Abbildung 16c2:

Immunhistochemische Färbung in 40-facher Vergrößerung zum Nachweis von neutrophilen Granulozyten in einer Bandscheibe der Traumagruppe. Es lassen sich neutrophile Granulozyten (Pfeile) sowohl in traumabedingten Defekten der Bandscheibe (siehe Abb. **15c1**) als auch in geringerer Anzahl, im Gewebe selbst nachweisen.

Die immunhistochemische Färbung auf CD66 positive neutrophile Granulozyten zeigt, dass in der Kontrollgruppe keine bis vereinzelte Zellen nachweisbar sind, während dieser Zelltyp in der degenerativen Gruppe vereinzelt, aber konsistent und in der Traumagruppe regelhaft nachweisbar ist. Diese Zellen lassen sich vor allem in Gewebespalten, in der Traumagruppe jedoch auch im Gewebe selber nachweisen.

Makrophagen (CD68):

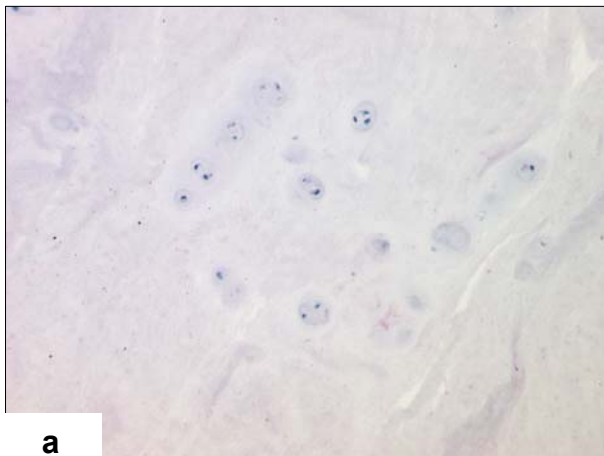
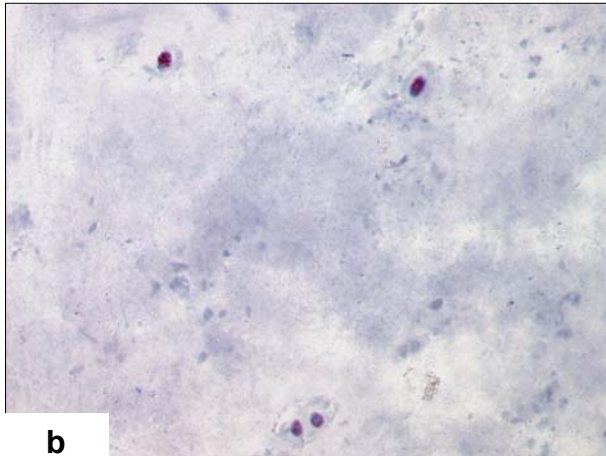


Abbildung 17a:

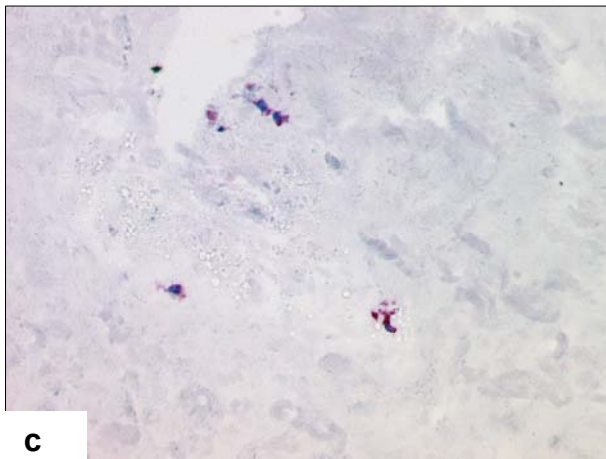
Immunhistochemische Färbung in 40-facher Vergrößerung zum Nachweis von CD68 positiven Makrophagen in einer Bandscheibe der Kontrollgruppe. Es lassen sich in dieser Gruppe kein Makrophagen nachweisen.



b

Abbildung 17b:

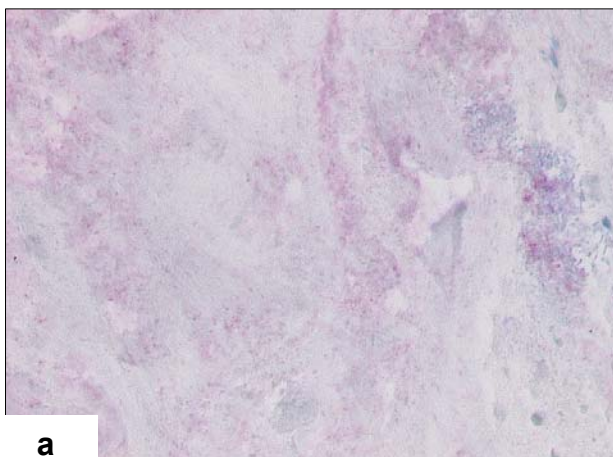
Immunhistochemische Färbung in 40-facher Vergrößerung zum Nachweis von CD68 positiven Makrophagen in einer Bandscheibe der degenerativen Gruppe. Es lassen sich in dieser Gruppe vereinzelt Makrophagen nachweisen.



c

Abbildung 17c:

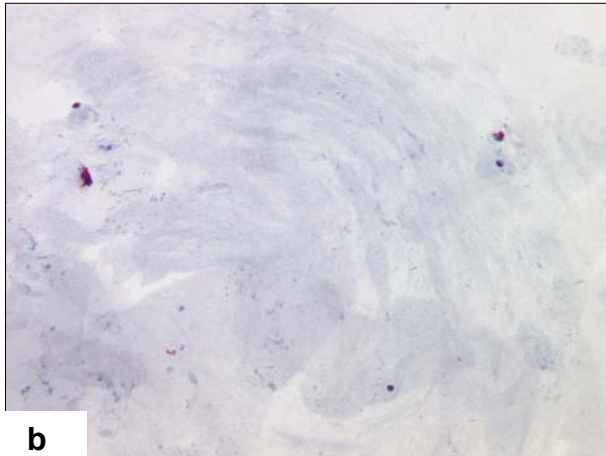
Immunhistochemische Färbung in 40-facher Vergrößerung zum Nachweis von CD68 positiven Makrophagen in einer Bandscheibe der Traumagruppe. Es lassen sich in dieser Gruppe regelhaft in allen Schnitten Makrophagen nachweisen.

Makrophagen (CD163):

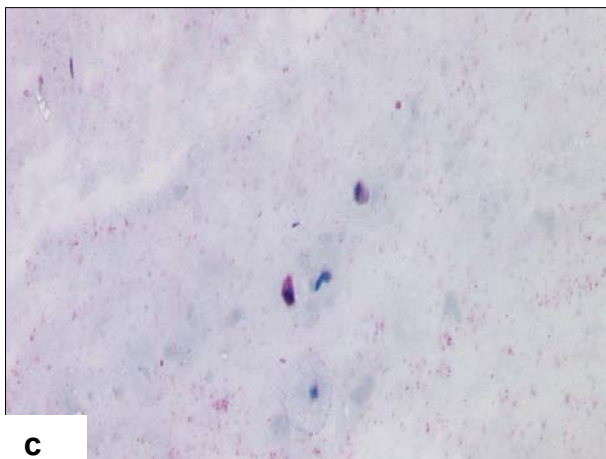
a

Abbildung 18a:

Immunhistochemische Färbung in 40-facher Vergrößerung zum Nachweis von CD163 positiven Makrophagen in einer Bandscheibe der Kontrollgruppe. Es lassen sich in dieser Gruppe keine CD163 positiven Makrophagen nachweisen.

**Abbildung 18b:**

Immunhistochemische Färbung in 40-facher Vergrößerung zum Nachweis von CD163 positiven Makrophagen in einer Bandscheibe der degenerativen Gruppe. Es lassen sich in dieser Gruppe CD163 positive Makrophagen nachweisen.

**Abbildung 18c:**

Immunhistochemische Färbung in 40-facher Vergrößerung von CD163 positiven Makrophagen in einer Bandscheibe der Traumagruppe. Es lassen sich in dieser Gruppe regelmässig CD163 positive Makrophagen nachweisen.

Die immunhistochemische Färbung auf CD68 positive Makrophagen, bei denen die Färbung unter Nutzung des Markers PGM-1 erfolgte, zeigt, dass in der Kontrollgruppe keine Zellen nachweisbar sind, während dieser Zelltyp in der degenerativen Gruppe vereinzelt und in der Traumagruppe regelhaft nachweisbar ist.

Die immunhistochemische Färbung auf CD163 positive Makrophagen, bei denen die Färbung unter Nutzung des Markers Ber-Mac3 erfolgte, zeigt, dass in der Kontrollgruppe keine Zellen nachweisbar sind, während dieser Zelltyp in der degenerativen Gruppe vereinzelt und in der Traumagruppe regelhaft nachweisbar ist.

8.2.2 Komplementaktivierung

Die gewebeständigen Komplementfaktoren C3c (als stabiles C3- Fragment) und C5b wurden immunhistochemisch auf Kryoschnitten gefärbt. Weiterhin erfolgte die immunhistochemische Färbung aller Proben auf den MAC/C5b-9 als einem Endprodukt der Komplementkaskade. Die Abbildungen 19a-c zeigen exemplarisch die Anfärbung auf C3c in Schnitten aus den zu vergleichenden Gruppen. Die Abbildungen 20a-c zeigen exemplarisch die Anfärbung auf C5b in Schnitten aus den zu vergleichenden Gruppen. Die Abbildungen 21a-c zeigen in gleicher Form Färbungen auf den MAC/C5b-9.

Komplementfaktor C3c

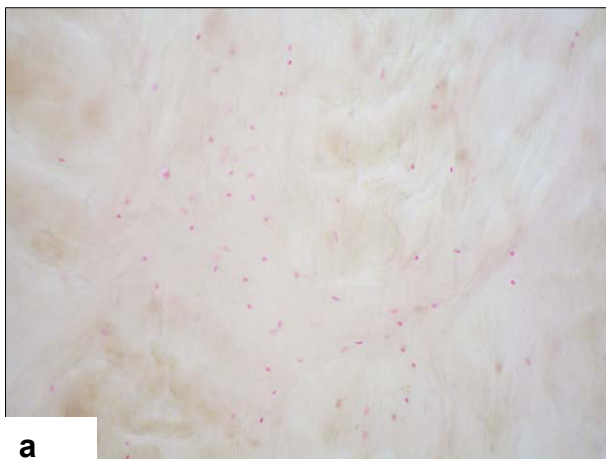


Abbildung 19a:

Immunhistochemische Färbung in 20-facher Vergrößerung zum Nachweis von C3c in einer Bandscheibe der Kontrollgruppe. Es lässt sich in dieser Gruppe kein C3c nachweisen.

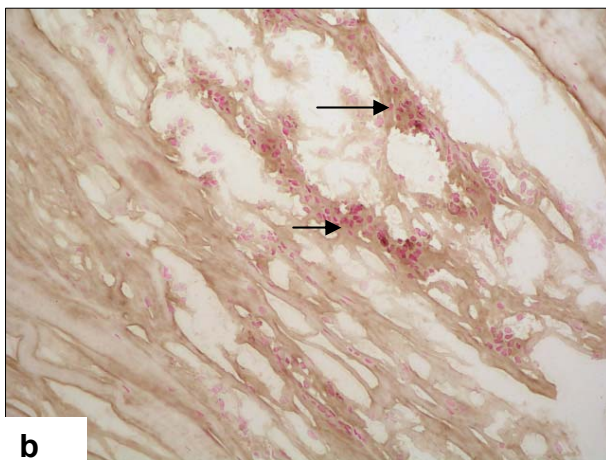
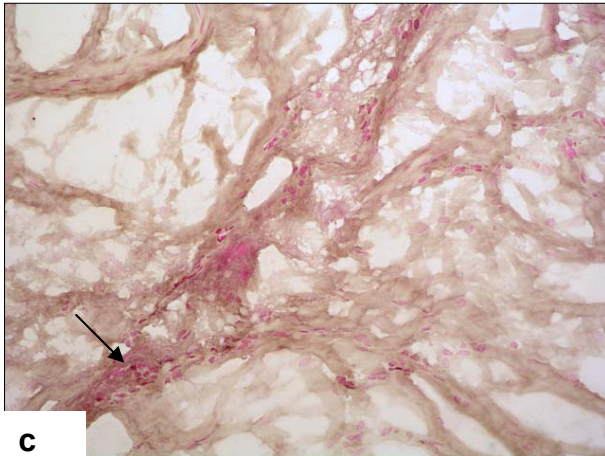


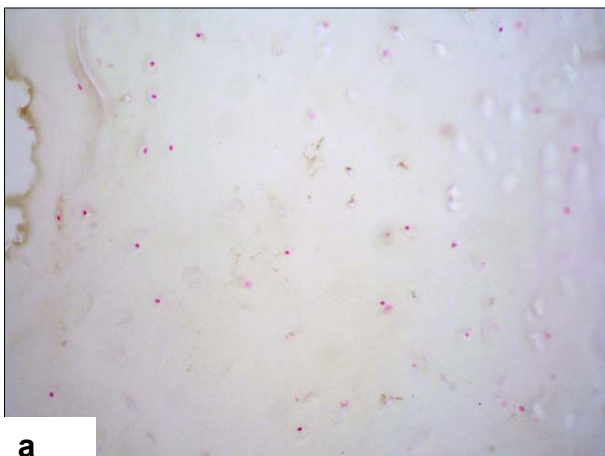
Abbildung 19b:

Immunhistochemische Färbung in 20-facher Vergrößerung zum Nachweis von C3c in einer Bandscheibe der degenerativen Gruppe. Es lässt sich in dieser Gruppe C3c, besonders in der Nähe infiltrierender Zellen (intensivere Braunfärbung, Pfeil), nachweisen.

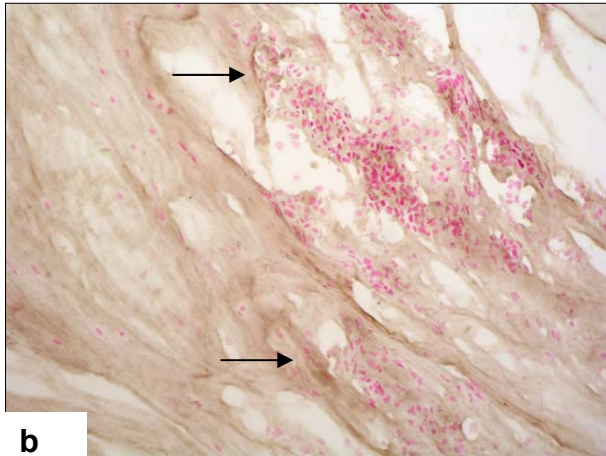
**Abbildung 19c:**

Immunhistochemische Färbung in 20-facher Vergrößerung zum Nachweis von C3c in einer Bandscheibe der Traumagruppe. Es lässt sich in dieser Gruppe eine regelhaft intensive Deposition (Pfeil, intensivere Braunfärbung) von C3c nachweisen.

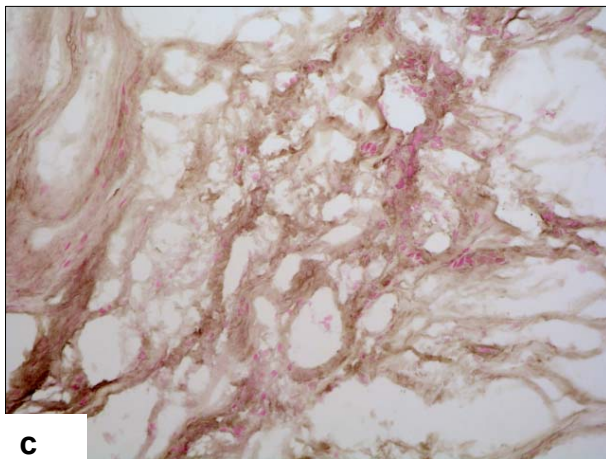
Die immunhistochemischen Färbungen auf den gewebeständigen Mediator der Komplementkaskade C3c als stabilem C3- Fragment zeigen, dass in der Kontrollgruppe keine Deposition von C3c nachweisbar ist. In der degenerativen Gruppe lässt sich C3c inkonsistent nachweisen, während sich C3c in der Traumagruppe regelhaft intensiv nachweisen lässt.

Komplementfaktor C5b**Abbildung 20a:**

Immunhistochemische Färbung in 20-facher Vergrößerung zum Nachweis von C5b in einer Bandscheibe der Kontrollgruppe. Es lässt sich in dieser Gruppe kein C5b nachweisen.

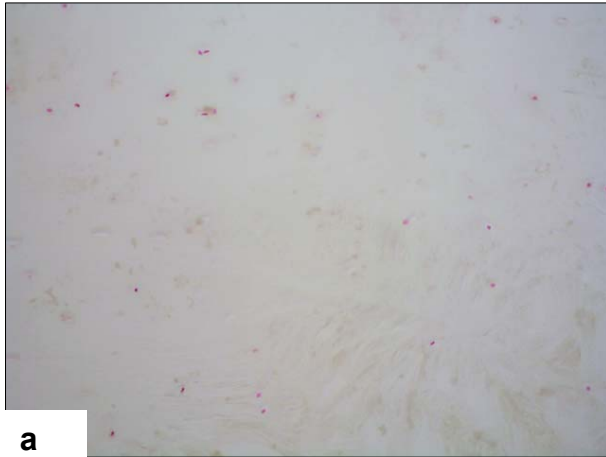
**Abbildung 20b:**

Immunhistochemische Färbung in 20-facher Vergrößerung zum Nachweis von C5b in einer Bandscheibe der degenerativen Gruppe. Es lässt sich durch die Braunfärbung in dieser Gruppe C5b, häufig in der Umgebung infiltrierender Zellen (Pfeil) nachweisen.

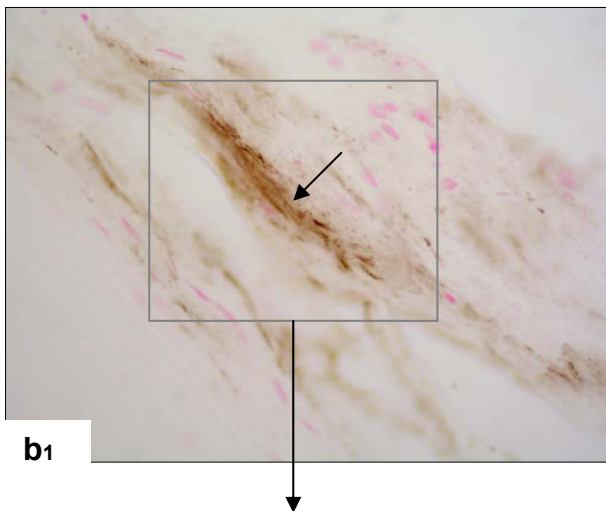
**Abbildung 20c:**

Immunhistochemische Färbung in 20-facher Vergrößerung zum Nachweis von C5b in einer Bandscheibe der Traumagruppe. Es lässt sich durch die intensive Braunfärbung in dieser Gruppe, häufig in der Nähe infiltrierender Zellen, regelhaft der Faktor C5b nachweisen.

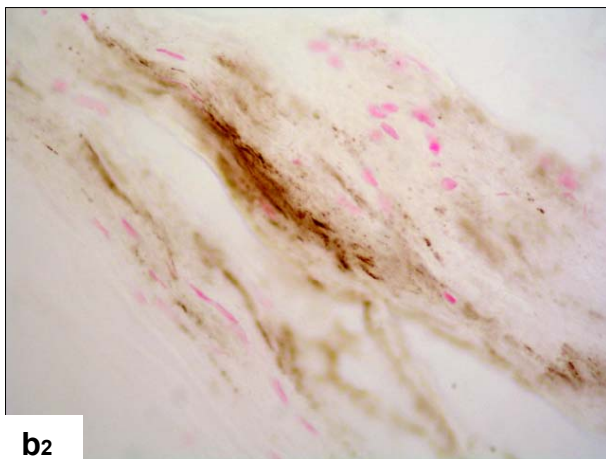
Die immunhistochemischen Färbungen auf den gewebeständigen Mediator C5b der Komplementkaskade zeigen, dass in der Kontrollgruppe keine Deposition von C5b nachweisbar ist. In der degenerativen Gruppe lässt sich C5b besonders in der Umgebung infiltrierender Zellen nachweisen. In der Traumagruppe lässt sich C5b regelhaft intensiv nachweisen.

Membrane attack complex MAC/C5b-9:**Abbildung 21a:**

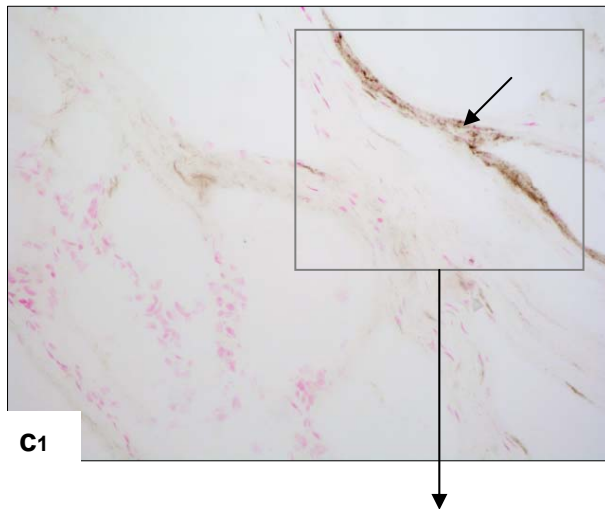
Immunhistochemische Färbung in 20-facher Vergrößerung zum Nachweis von MAC/C5b-9 in einer Bandscheibe der Kontrollgruppe. Es lässt sich in dieser Gruppe kein MAC/C5b-9 nachweisen.

**Abbildung 21b1 und 21b2**

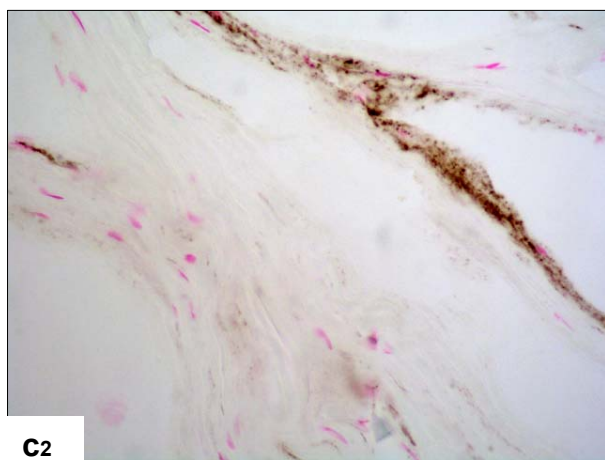
21b1 Immunhistochemische Färbung in 20-facher Vergrößerung zum Nachweis von MAC/C5b-9 in einer Bandscheibe der degenerativen Gruppe. Es lässt sich in dieser Gruppe der MAC/C5b-9 (Pfeil) nachweisen.



21b2: Es wird eine Ausschnitts-Vergrößerung des in Abbildung 20b1 markierten Bereiches mit der MAC/C5b-9-Deposition gezeigt



C1



C2

Abbildung 21c1 und 21c2:

21c1: Immunohistochemische Färbung in 20-facher Vergrößerung zum Nachweis von MAC/C5b-9 in einer Bandscheibe der Trauma-Gruppe. Es lässt sich in dieser Gruppe regelmäßig MAC/C5b-9 (Pfeil) nachweisen.

21c2: Es wird eine Ausschnitts-Vergrößerung des in Abbildung 20c1 markierten Bereiches mit der MAC/C5b-9-Deposition gezeigt.

Die immunohistochemischen Färbungen auf den MAC/C5b-9 als Enprodukt der Komplementkaskade zeigen, dass in der Kontrollgruppe keine Deposition von MAC/C5b-9 nachweisbar ist. In der degenerativen Gruppe lässt sich der MAC/C5b vereinzelt, vor allem in der Umgebung infiltrierender Zellen nachweisen. In der Traumagruppe lässt sich der MAC/C5b-9 regelhaft nachweisen.

8.3 Apoptose in traumatisierten Bandscheiben

8.3.1 Nachweis apoptotischer Zellen

Zum Nachweis apoptotischer Zellen wurden alle Proben der drei Untersuchungsgruppen mittels der TUNEL-Färbung untersucht, dazu wurden Kryoschnitte verwendet. In allen so untersuchten Schnitten wurde eine DAPI-Färbung als Gegenfärbung zur Darstellung aller, sowohl der lebenden als auch der abgestorbenen Zellkerne durchgeführt. In einem nächsten Schritt wurden HE-Paraffinschnitte aller drei Untersuchungsgruppen angefertigt, um morphologisch apoptotische intradiskale Zellen darzustellen. Die Abbildungen 22a bis 24c zeigen exemplarisch die Färbungen für je eine Probe der verschiedenen Untersuchungsgruppen.

TUNEL- , DAPI-Gegenfärbung und HE- Färbung Kontrollgruppe

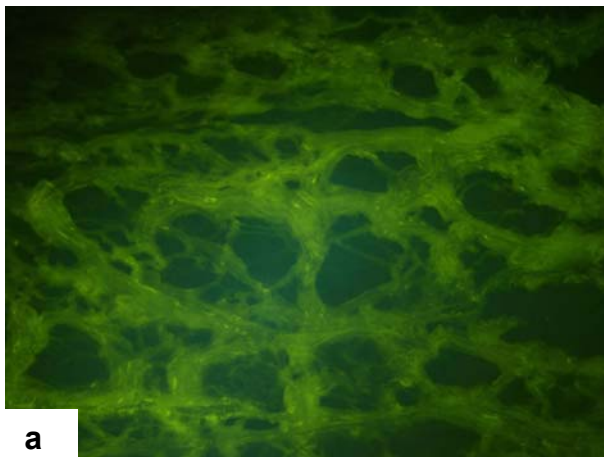


Abbildung 22a:

TUNEL- Färbung in 20facher Vergrößerung einer Bandscheibe aus der Kontrollgruppe: Es lassen sich keine apoptotischen Zellen darstellen.

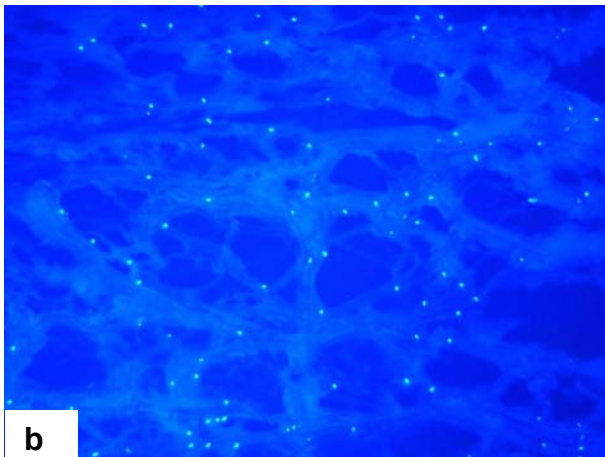


Abbildung 22b:

DAPI- Kernfärbung in 20facher Vergrößerung einer Bandscheibe aus der Kontrollgruppe: Es lassen sich Zellkerne nachweisen.

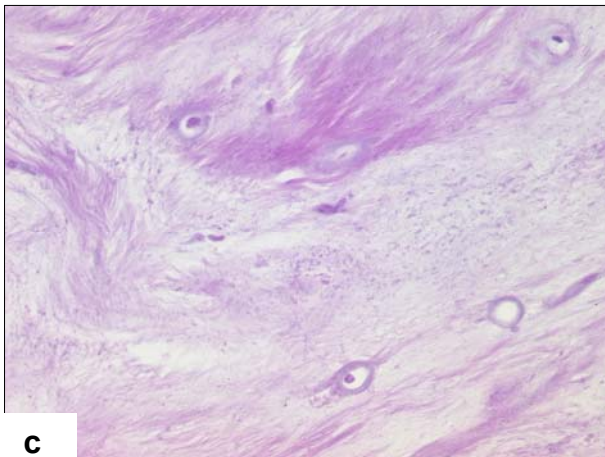


Abbildung 22c:

HE- Färbung einer Bandscheibe aus der Kontrollgruppe in 100-facher Vergrößerung. Es lassen sich morphologisch keine Anzeichen für Apoptose nachweisen.

TUNEL- , DAPI-Gegenfärbung und HE- Färbung degenerative Gruppe

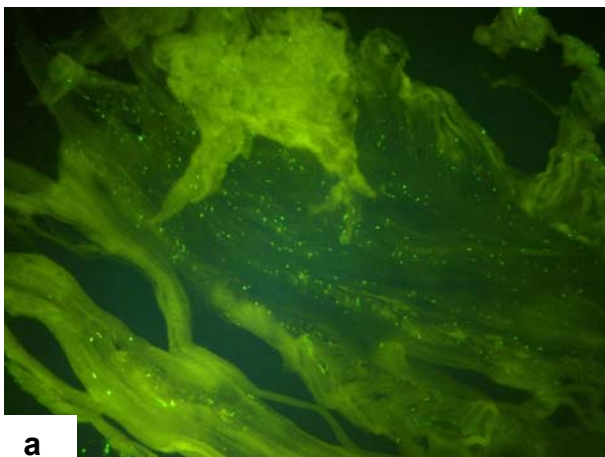


Abbildung 23a:

TUNEL- Färbung in 20facher Vergrößerung einer Bandscheibe aus der degenerativen Gruppe: Es lassen sich apoptotische Zellen darstellen.

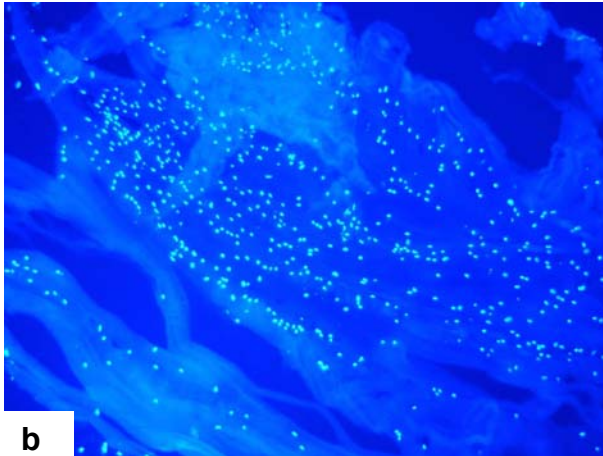


Abbildung 23b:

DAPI- Kernfärbung in 20facher Vergrößerung einer Bandscheibe aus der degenerativen Gruppe: Es lassen sich eine Reihe von Zellkernen nachweisen.

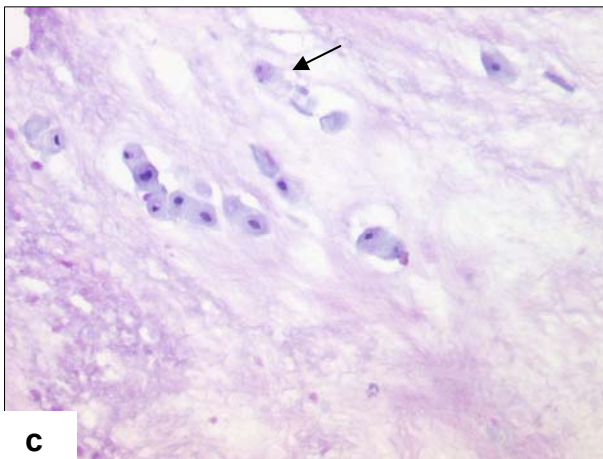


Abbildung 23c:

HE- Färbung einer Bandscheibe aus der degenerative Gruppe in 100-facher Vergrößerung. Es lassen sich morphologisch nur vereinzelt Anzeichen (Pfeil) für Apoptose nachweisen.

TUNEL- , DAPI-Gegenfärbung und HE- Färbung Traumagruppe

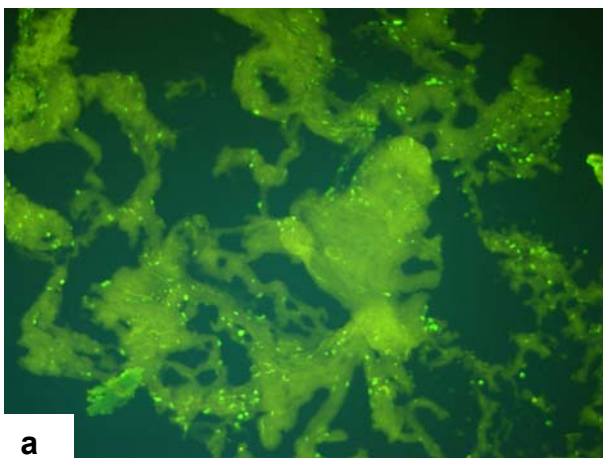
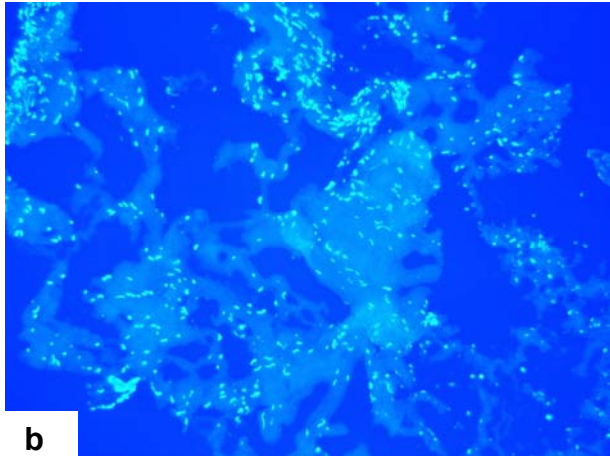


Abbildung 24a:

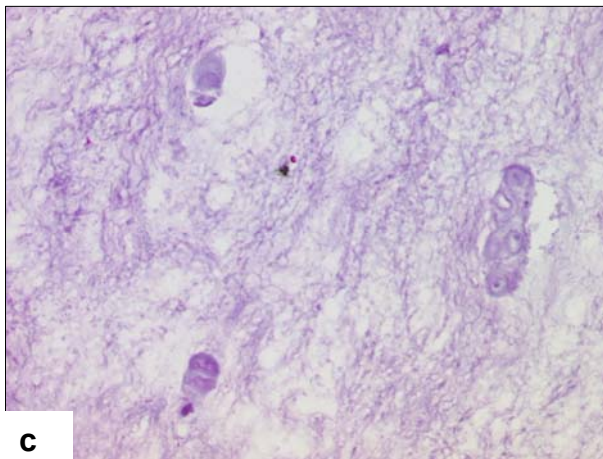
TUNEL- Färbung in 20facher Vergrößerung einer Bandscheibe aus der Traumagruppe: Es lassen sich reichlich apoptotische Zellen darstellen.



b

Abbildung 24b:

DAPI- Kernfärbung in 20facher Vergrößerung einer Bandscheibe aus der Traumagruppe: Es lassen sich eine große Anzahl von Zellkernen nachweisen.



c

Abbildung 24c:

HE- Färbung einer Bandscheibe aus der Traumagruppe in 100-facher Vergrößerung. Es lassen sich morphologisch deutliche Anzeichen für Apoptose nachweisen: es zeigen sich apoptotische Chondrozyten mit einer fehlenden Anfärbbarkeit der Kerne und Eosinophilie

In der Kontrollgruppe zeigt die DAPI- Gegenfärbung Zellkerne. Es lassen sich in der TUNEL-Färbung jedoch keine apoptotischen Zellen nachweisen. Ebenso zeigt die Ausschnittsvergrößerung einer HE- Übersichtsfärbung keine morphologischen Hinweise auf Apoptose. Somit lässt sich in dieser Gruppe Apoptose ausschließen. In der degenerativen Gruppe zeigen sich in der TUNEL-Färbung apoptotische Zellen bei einer in der DAPI- Färbung hohen Zelldichte, aber in der HE- Färbung nur sehr vereinzelt ortständige apoptotische Zellen. Es findet also Apoptose statt, welche zum einen Teil in intradiskalen, zum anderen Teil offensichtlich in migrierenden Zellen stattzufinden scheint. In der Traumgruppe zeigt sich bei einer hohen Zelldichte in der DAPI-Färbung eine hohe Apoptoserate in der TUNEL-Färbung. Hier kann die Apoptose migrierender Zellen ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Die HE- Färbungen belegen jedoch in den Trauma- Bandscheiben konsistent die Apoptose ortständiger intradiskaler Zellen.

8.3.2 Analyse der Caspase 3/7, Caspase 8 und Caspase 9 Aktivität

Die Bestimmung der Aktivität der Caspase 3/7 als zentralen Caspasen der Apoptosekaskade erfolgte flourometrisch. Dabei wurde die Aktivität der Caspase 3/7 zwischen den drei Untersuchungsgruppen verglichen. Der Durchschnittswert in der Kontrollgruppe beträgt 560,0 RLU (SE:91,57952828, SD:204,7780506), der Durchschnittswert in der Traumagruppe beträgt 3119,90625 RLU (SE:404,8857176, SD:1619,54287) und der Durchschnittswert der degenerativen Gruppe 5840 RLU (SE:854,0892225, SD:1909,80156) (Diagramm 8). Die Vergleiche zwischen der Traumagruppe und der Kontrollgruppe und zwischen der degenerativen Gruppe und der Kontrollgruppe zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0.05$).

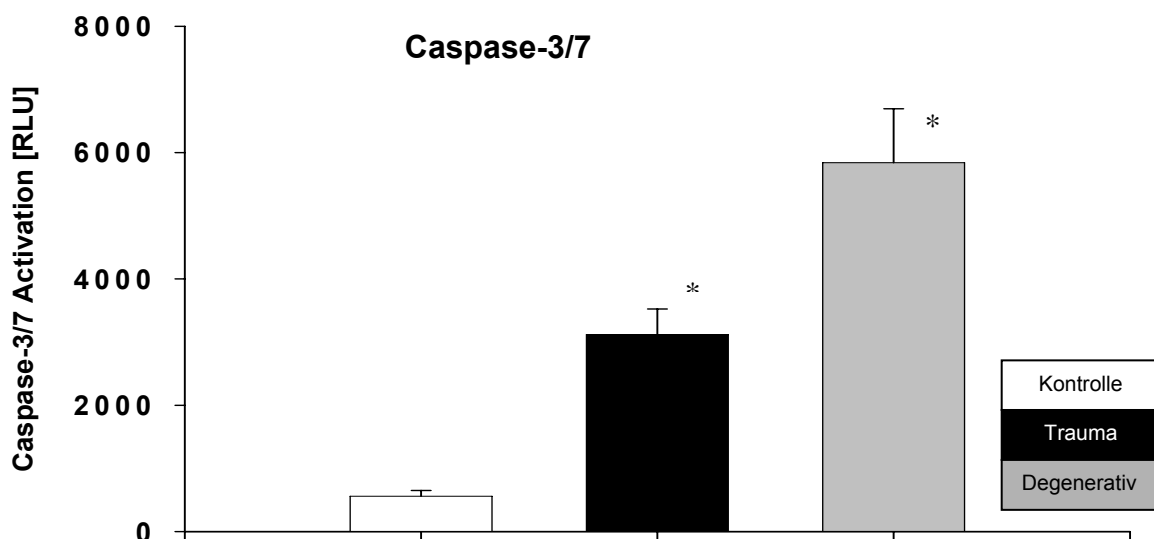


Diagramm 8: Vergleich der Caspase 3/7 Aktivität (Mittelwert+SD) zwischen den drei Untersuchungsgruppen. Die Aktivität in der Traumagruppe und in der degenerativen Gruppe ist im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht ($p < 0,05$). Der Unterschied zwischen der Traumagruppe und der degenerativen Gruppe ist ebenfalls signifikant ($p < 0.05$).

Die Bestimmung der Aktivität der Caspase 8 als Bestandteil des extrinsischen Aktivierungsweges und der Caspase 9 als Bestandteil des intrinsischen Aktivierungsweges der Apoptosekaskade erfolgte flourometrisch. Dabei wurden die Aktivität der Caspase 8 und der Caspase 9 zwischen den verschiedenen Untersuchungsgruppen verglichen.

Der Durchschnittswert für Caspase 8 beträgt in der Kontrollgruppe 40 RLU (SE:20, SD:28,28427), in der Traumagruppe 460,65789 RLU (SE:53,77196178, SD:234,39526) und in der degenerativen Gruppe 327 RLU (SE:53,01179114, SD:91,81911) (**Diagramm 9**). Die Vergleiche zwischen der Traumagruppe und der Kontrollgruppe und zwischen der degenerativen Gruppe und der Kontrollgruppe zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0.05$).

Der Durchschnittswert für Caspase 9 beträgt in der Kontrollgruppe 186 RLU (SE:125,5, SD:177,483802) in der Traumagruppe 1726,55882 RLU (SE:220,9288833, SDD:910,91312) und in der degenerativen Gruppe 1204 RLU (SE:187,3609484, SD:374,7218969) (**Diagramm 10**). Die Vergleiche zwischen der Traumagruppe und der Kontrollgruppe und zwischen der degenerativen Gruppe und der Kontrollgruppe zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0.05$).

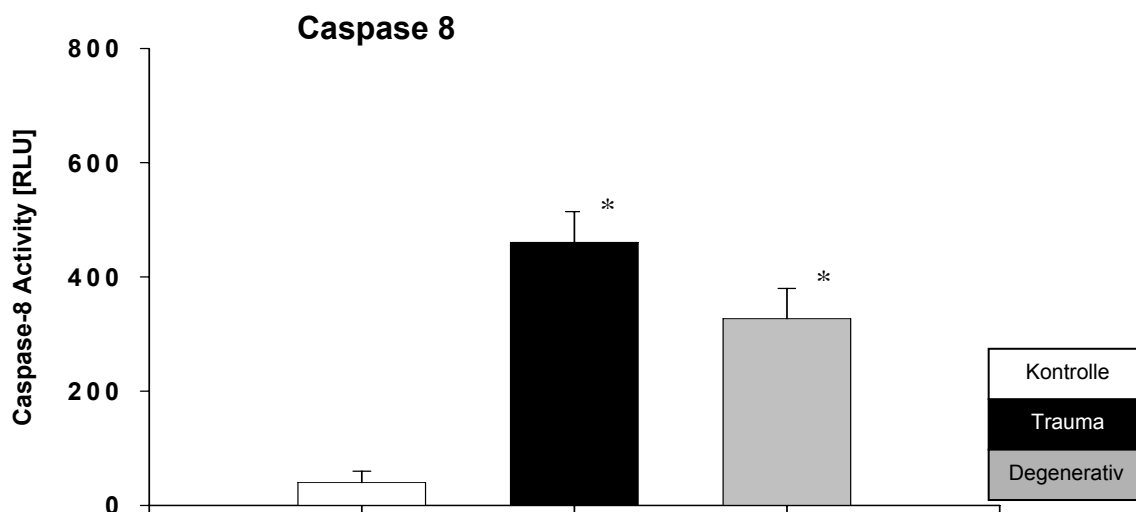


Diagramm 9: Vergleich der Caspase 8 Aktivität (Mittelwert+SD) zwischen den drei Untersuchungsgruppen. Die Aktivität in der Traumagruppe und in der degenerativen Gruppe ist im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht ($p < 0.05$). Der Unterschied zwischen der degenerativen Gruppe und der Traumagruppe ist nicht signifikant.

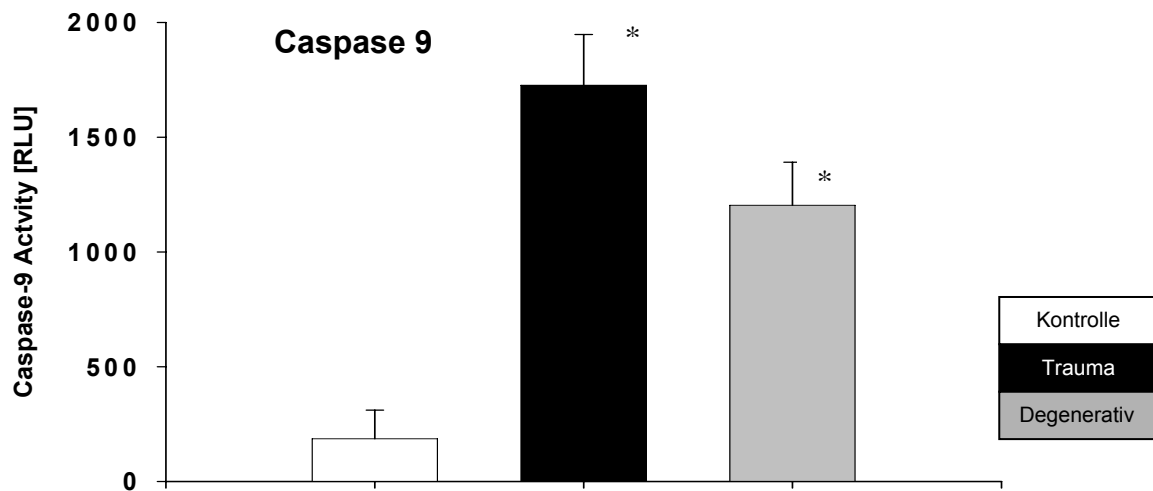


Diagramm 10: Vergleich der Caspase 9 Aktivität (Mittelwert+SD) zwischen den drei Untersuchungsgruppen. Die Aktivität ist sowohl in der Traumagruppe als auch in der degenerativen Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht ($p < 0.05$). Der Unterschied zwischen der degenerativen Gruppe und der Traumagruppe ist nicht signifikant.

8.3.3 Genexpression von pro- apoptotischen Mediatoren

Die Expression von pro- apoptotischen Komponenten des extrinsischen und des intrinsischen Weges der Apoptoseaktivierung wurde in allen entnommenen Proben aller Untersuchungsgruppen mittels Bestimmung der mRNA analysiert. Dazu wurden die Expression des TNF- Rezeptors1 und des Fas- Rezeptors sowie ihrer Liganden TNF α und FasL gemessen. Die Expression des pro- apoptotischen Bax und des anti- apoptotischen Bcl-2 als Vermittler der intrinsischen Apoptoseaktivierung wurde in allen drei Gruppen ebenfalls vergleichend gemessen. Die Messung der Expression erfolgte mittels des relativen Expressionsniveaus „relative expression level“ (REL) im Vergleich zum β -Aktin housekeeping Gen als Referenz.

TNF- Rezeptor1:

Die Resultate der Messungen für den TNF-Rezeptor1 sind in Diagramm 11 dargestellt.

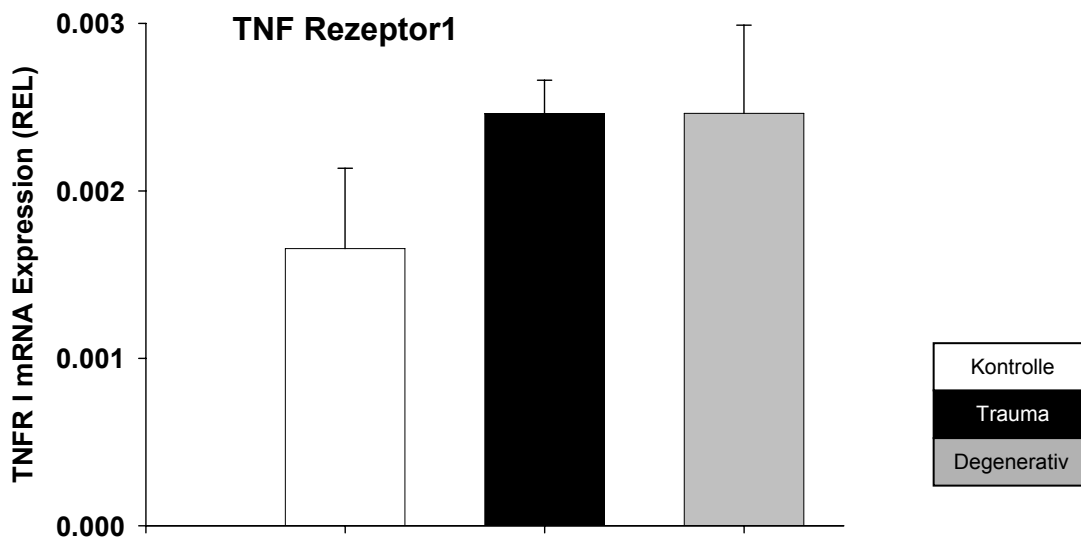


Diagramm 11: Vergleich der Expression des TNF-Rezeptors1 (Mittelwert+SD) zwischen den drei Untersuchungsgruppen. Die Expression ist in der Traumagruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe moderat erhöht. Der Unterschied zwischen der degenerativen Gruppe und der Traumagruppe ist nicht signifikant, ebenso nicht zwischen der degenerativen Gruppe und der Kontrollgruppe.

Der Durchschnittswert für den TNF-Rezeptor1 beträgt in der Kontrollgruppe 0,00165531 REL (SE:0,00047981, SD:0,00083105), in der Traumagruppe 0,002246081 REL (SE:0,00020014, SD:0,00084914) und in der degenerativen Gruppe 0,0024626 REL (SE:0,0005264, SD:0,0010526).

Der Vergleich zwischen den Gruppen zeigt keine signifikanten Unterschiede.

TNF α :

Die Resultate der Messungen für TNF α sind in **Diagramm 12** dargestellt.

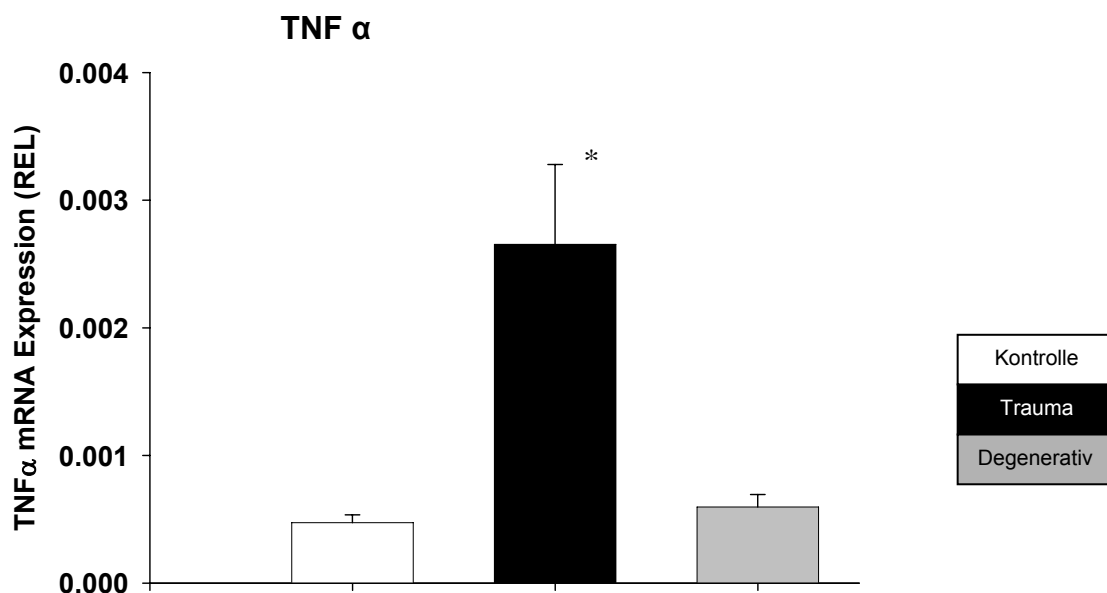


Diagramm 12: Vergleich der Expression von TNF α (Mittelwert+SD) zwischen den drei Untersuchungsgruppen. Die Expression ist in der Traumagruppe im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen signifikant erhöht ($p < 0.05$).

Der Durchschnittswert für den TNF α beträgt in der Kontrollgruppe 0,0004736 REL (SE:6,2105E-05, SD:0,00010757), in der Traumagruppe 0,000265376 REL (SE:0,00062502, SD:0,00139759) und in der degenerativen Gruppe 0,00059615 REL (SE:9,7085E-05, SD:0,00016816). Der TNF α -Wert in der Traumagruppe ist signifikant erhöht ($p < 0.05$).

Fas-Rezeptor:

Die Resultate der Messungen für den Fas-Rezeptor sind in **Diagramm 13** dargestellt.

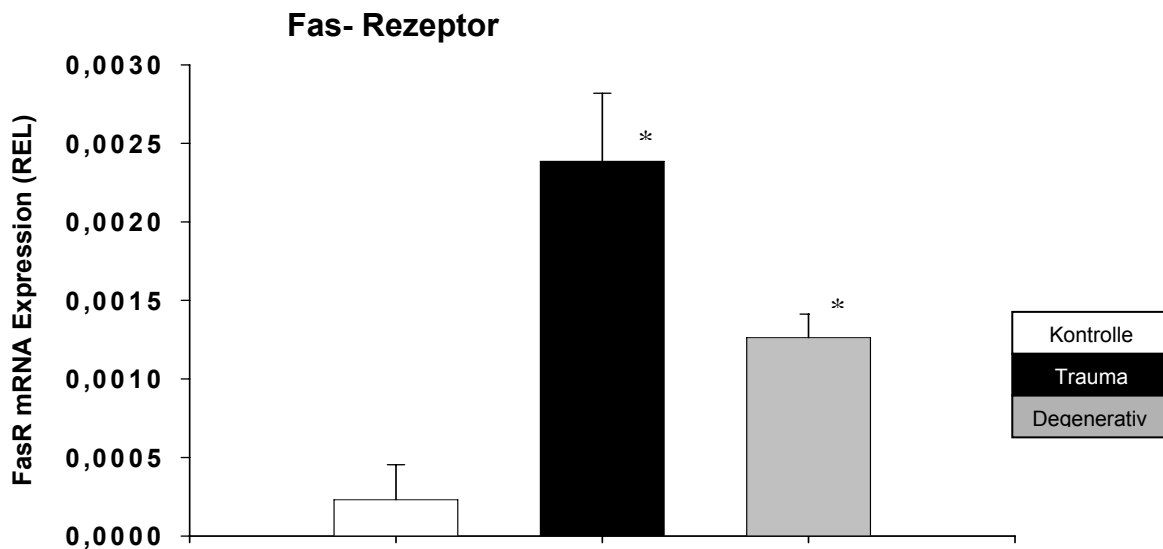


Diagramm 13: Vergleich der Expression des Fas- Rezeptors (Mittelwert+SD) zwischen den drei Untersuchungsgruppen. Die Expression ist in der Traumagruppe und in der degenerativen Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht ($p < 0.05$).

Der Durchschnittswert für den Fas-Rezeptor beträgt in der Kontrollgruppe 0,00023035 REL (SE:0,00022359, SD:0,0003162), in der Traumagruppe 0,00238615 REL (SE:0,00043333, SD:0,00122565) und in der degenerativen Gruppe 0,00126312 REL (SE:0,00014994, SD:0,0002597).

Die Vergleiche zwischen der Traumagruppe und der Kontrollgruppe und zwischen der degenerativen Gruppe und der Kontrollgruppe zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0.05$).

Fas-L:

Die Resultate der Messungen für Fas-L sind in **Diagramm 14** dargestellt.

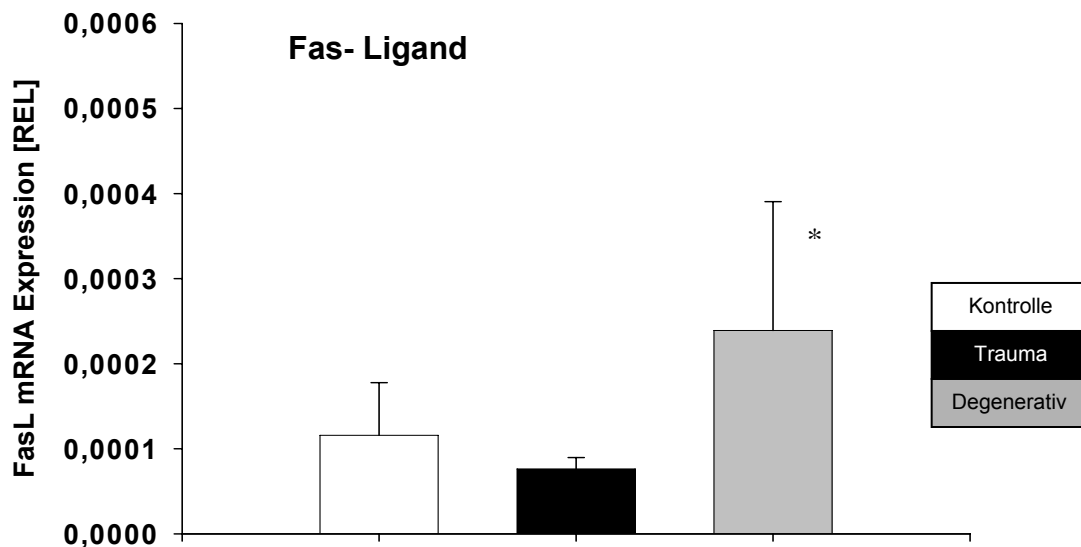


Diagramm 14: Vergleich der Expression des Fas- Liganden (Mittelwert+SD) zwischen den drei Untersuchungsgruppen. Zwischen der Traumagruppe und der degenerativen Gruppe zeigen sich im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede. Der Unterschied zwischen der Traumagruppe und der degenerativen Gruppe ist signifikant ($p < 0.05$).

Der Durchschnittswert für den Fas-Liganden beträgt in der Kontrollgruppe 0,00011573 REL (SE:6,2078E-05, SD:0,0001075), in der Traumagruppe 7,6258E-05 REL (SE:1,3395E-05, SD:4,6403E-05) und in der degenerativen Gruppe 0,00023896 REL (SE:0,00015163, SD:0,00026263).

Bezüglich der Traumagruppe und der degenerativen Gruppe zeigen sich im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede. Der Unterschied zwischen der Traumagruppe und der degenerativen Gruppe ist signifikant ($p < 0.05$).

Bax:

Die Resultate der Messungen für den pro-apoptotischen Mediator Bax sind in **Diagramm 15** dargestellt.

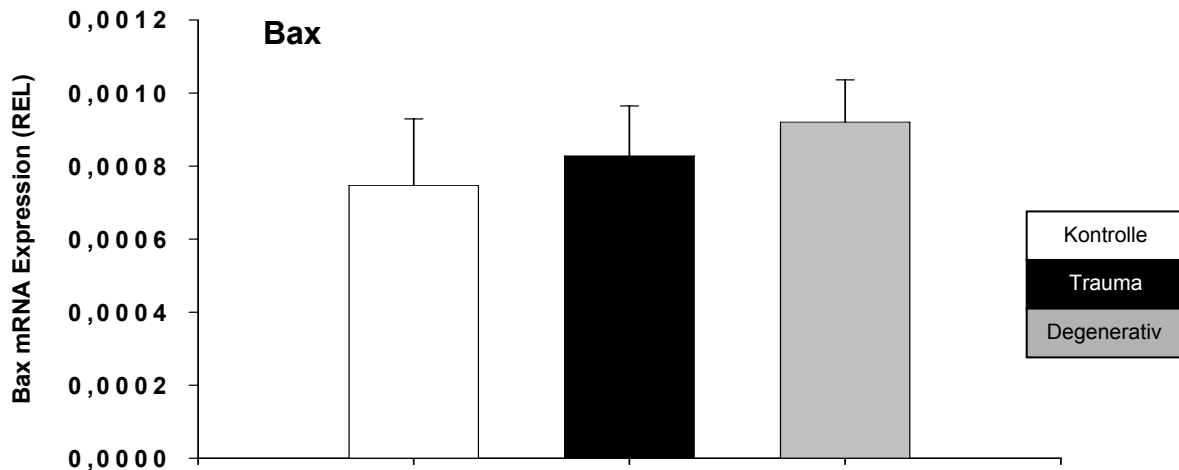


Diagramm 15: Vergleich der Expression des pro- apoptotischen Bax (Mittelwert+SD) zwischen den drei Untersuchungsgruppen. Die Expression zeigt in allen drei Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

Der Durchschnittswert für den pro- apoptotischen Mediator Bax beträgt in der Kontrollgruppe 0,00074707 REL (SE:0,00018226, SD:0,00036453), in der Traumagruppe 0,00082809 REL (SE:0,00013662, SD:0,00043202) und in der degenerativen Gruppe 0,00092057 REL (SE:0,00011581, SD:0,00028368).

Zwischen den einzelnen Gruppen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede.

Bcl-2:

Die Resultate der Messungen für den anti-apoptotischen Mediator BCL-2 sind in **Diagramm 16** dargestellt.

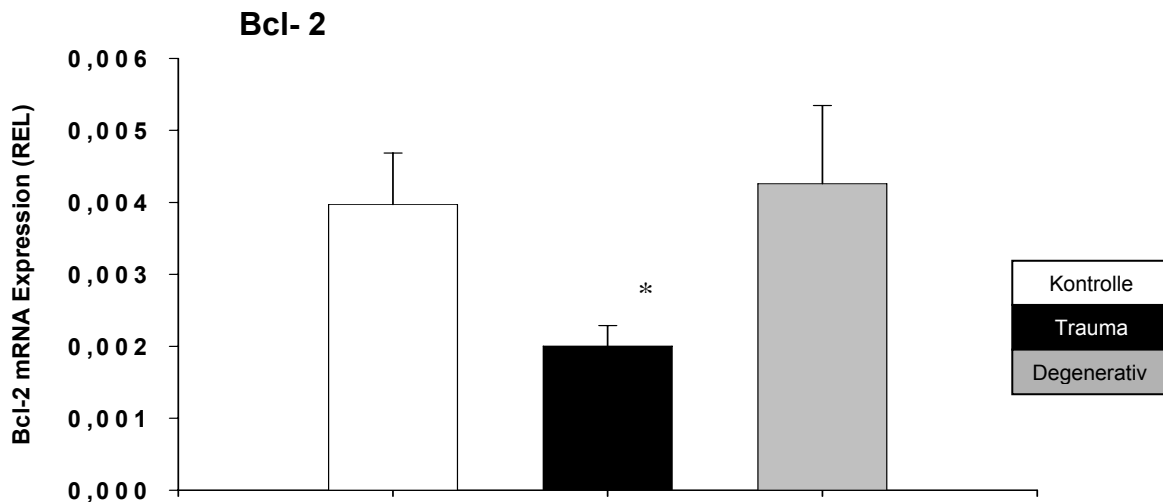


Diagramm 16: Vergleich der Expression des anti- apoptotischen Bcl-2 (Mittelwert+SD) zwischen den drei Untersuchungsgruppen. Die Expression zeigt sich in der Traumagruppe im Vergleich zur Kontroll- und degenerativen Gruppe signifikant erniedrigt ($p < 0.05$).

Der Durchschnittswert für den anti- apoptotischen Mediators Bcl-2 beträgt in der Kontrollgruppe 0,00396837 REL (SE:0,00071633, SD:0,00143267), in der Traumagruppe 0,00200358 REL (SE:0,0002855, SD:0,00075537) und in der degenerativen Gruppe 0,00425761 REL (SE:0,00108768, SD:0,00108768).

Es zeigte sich eine signifikante Herabregulation in der Traumagruppe im Vergleich zur Kontroll- und zur degenerativen Gruppe ($p < 0.05$).

8.3.4 Immunhistochemische Färbung apoptoserelevanter Proteine

BCL-2:

Das anti-apoptischen Bcl-2 als Mediator der intrinsischen Apoptosekaskade wurde immunhistochemisch auf Paraffinschnitten mittels des spezifischen Antikörpers gefärbt und nachfolgend exemplarisch für alle drei Untersuchungsgruppen in den Abbildungen **25a** bis **25c** gezeigt.

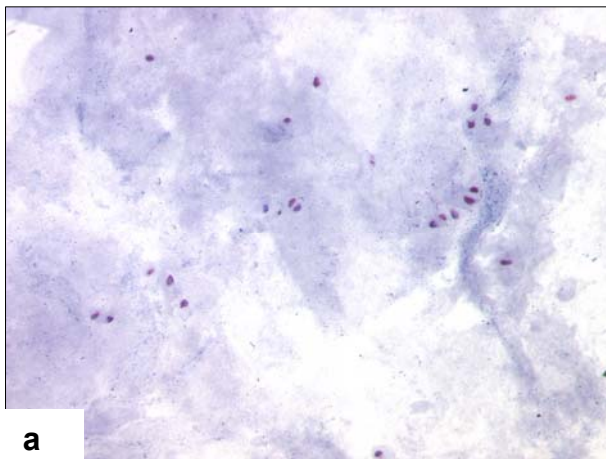


Abbildung 25a:

Immunhistochemische Färbung einer Bandscheibe aus der Kontrollgruppe in 40-facher Vergrößerung auf Bcl-2. Es lässt sich eine konstante Bcl-2-Expression in den Chondrozyten nachweisen.

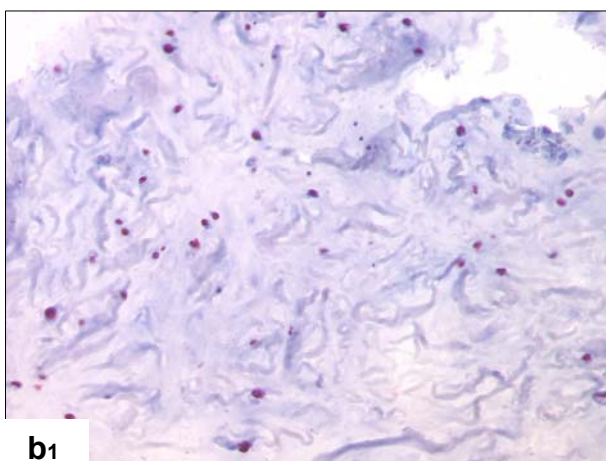
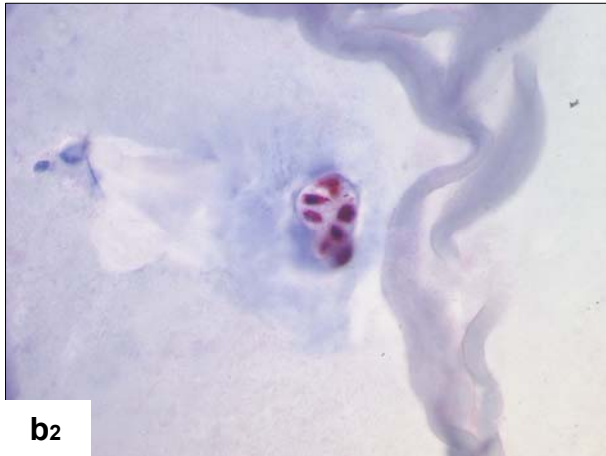
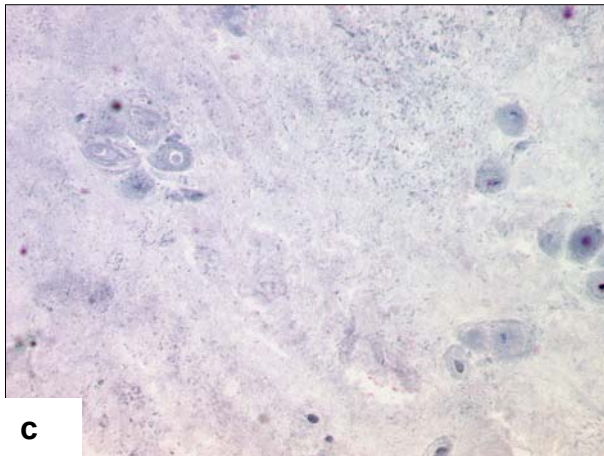


Abbildung 25b1:

Immunhistochemische Färbung einer Bandscheibe aus der degenerativen Gruppe in 40-facher Vergrößerung auf Bcl-2. Es lässt sich eine Bcl-2-Expression konstant in den Chondrozyten nachweisen.

**Abbildung 25b2:**

Immunhistochemische Färbung einer Bandscheibe auf Bcl-2 aus der degenerativen Gruppe in 100 facher Ausschnittsvergrößerung. Es kann hier exemplarisch deutlich die intrazelluläre Anfärbung des anti-apoptotischen Bcl-2 gezeigt werden.

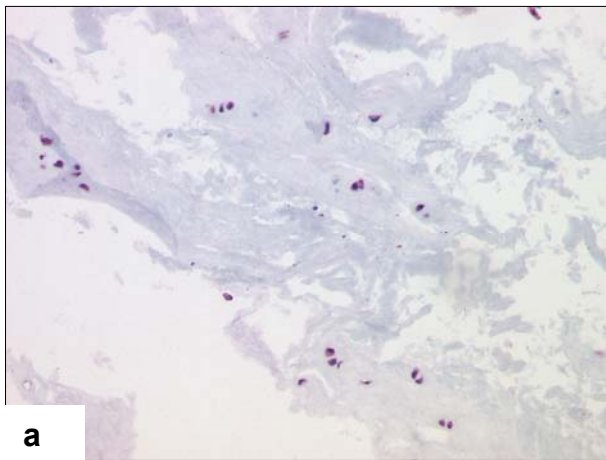
**Abbildung 25c:**

Immunhistochemische Färbung einer Bandscheibe aus der Traumagruppe in 40-facher Vergrößerung auf Bcl-2. Es lässt sich keine Bcl-2-Expression nachweisen. Die morphologische Interpretation zeigt deutlich abgestorbene Chondrozyten.

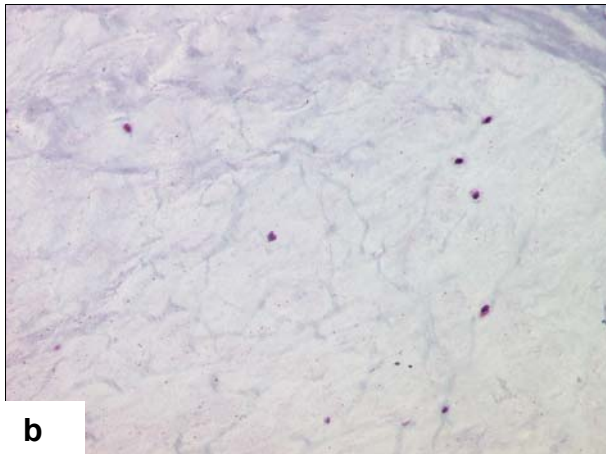
Die Abbildungen 25a bis 25c zeigen, dass sowohl in der Kontroll- als auch in der degenerativen Gruppe das anti-apoptotische Bcl-2 als Regulator des intrinsischen Aktivierungsweges der Apoptosekaskade immunhistochemisch intrazellulär nachweisbar ist, während in der Traumagruppe dieser anti-apoptotische Mediator nicht nachzuweisen ist. Morphologisch zeigen sich in der Gruppe der traumatisch geschädigten Bandscheiben eindeutig untergehende bzw. abgestorbene Chondrozyten (Abb. 26c).

Fas-Rezeptor:

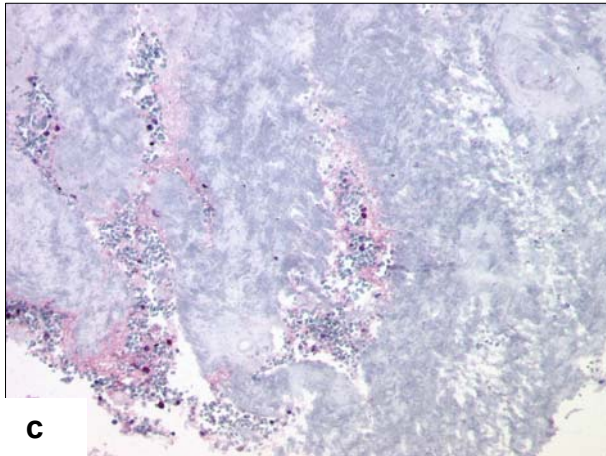
Es erfolgte eine immunhistochemische Färbung auf den Fas-Rezeptor als Bestandteil des Aktivierungsweges der rezeptorvermittelten Apoptosekaskade mittels spezifischer Antikörper auf Paraffinschnitten. Nachfolgend werden exemplarisch Beispiele für die drei Untersuchungsgruppen in den Abbildungen **26a** bis **26c** gezeigt.

**Abbildung 26a:**

Immunhistochemische Färbung einer Bandscheibe aus der Kontrollgruppe in 40-facher Vergrößerung auf den Fas-Rezeptor. Es lässt sich regelmäßig eine Expression nachweisen.

**Abbildung 26b:**

Immunhistochemische Färbung einer Bandscheibe aus der degenerativen Gruppe in 40-facher Vergrößerung auf den Fas-Rezeptor. Es lässt sich konstant eine Expression nachweisen

**Abbildung 26c:**

Immunhistochemische Färbung einer Bandscheibe aus der Trauma Gruppe in 40-facher Vergrößerung auf den Fas-Rezeptor. Es lässt sich im Gewebe selber keine Anfärbung nachweisen, während in den infiltrierenden Zellen in den Gewebespalten Fas-R anfärbbar ist.

Die Abbildungen 26a bis 26c zeigen, dass sowohl in den Bandscheiben der gesunden Kontrollgruppe als auch in degenerativ veränderten Bandscheiben der Fas- Rezeptor immunhistochemisch nachweisbar ist. Im Gegensatz dazu lässt sich der Fas- Rezeptor im Gewebe der traumatisch geschädigten Bandscheiben nicht nachweisen. Es zeigen sich in dieser Gruppe jedoch Signale, die sich Zellen in den Gewebespalten zuordnen lassen. In dieser Gruppe lässt sich der Fas- Rezeptor somit nicht im eigentlichen Bandscheibengewebe, sondern nur in eingewanderten Zellen in den am ehesten traumatisch bedingten Gewebespalten nachweisen.

9. Diskussion

Sowohl bei konservativ als auch bei operativ behandelten Frakturen der thorakolumbalen Wirbelsäule kommt es im Langzeitverlauf nicht selten zu einem Korrekturverlust [52,167,170,171,185,193,194]. Dieser ist nach konservativer Therapie höher als nach operativer Therapie und nach operativer Versorgung abhängig von der Art der gewählten Vorgehensweise [58,169,182]. Der Korrekturverlust findet in bis zu zwei Dritteln des Gesamtkorrekturverlustes in den angrenzenden Bandscheiben statt [52,185,193]. Führt der Korrekturverlust zu einer konsekutiven Kyphosierung von mehr als 20°, kann dies zu einer Reihe von Langzeitproblemen mit teilweise erheblichen Auswirkungen auf den Patienten und seine Leistungs- und Arbeitsfähigkeit führen [59,103,141,167,204,206,216]. Durch die in der Regel kurzbogige Kyphose kommt es zu einer Verlagerung der Körperschwerpunktlinie nach vorn [26], diese führt zu einer kompensatorischen Beckenkipfung [194], und es kommt zu einer unphysiologischen Überbelastung der dorsalen Weichteilstrukturen [206]. Häufig kommt es zu einer kompensatorischen Hyperlordose der LWS [151] und es bilden sich dadurch und durch die angrenzende Kyphose Inkongruenzen der angrenzenden Wirbelgelenke mit konsekutiver Arthrose [192]. Eine verfrühte Degeneration der angrenzenden Bandscheiben mit den bekannten, sich in der Folgezeit ausbildenden Degenerationen im gesamten Bewegungssegment, sind eine Folge der initialen Veränderungen und können diese im weiteren Verlauf zusätzlich verstärken [216].

Viele Autoren machen posttraumatische Veränderungen in der Bandscheibe selbst als Ursache für die verfrühte Degeneration verantwortlich. Diskutiert wird eine direkte oder indirekte Schädigung der Bandscheibe durch das zu Grunde liegende Trauma [44,51,79,132,187]. Aus einer, wenn auch geringen Anzahl von Publikationen mit sowohl tierexperimentellen, als auch humanen Studien ist bekannt, dass immunologische Veränderungen für die degenerativ verursachten Veränderungen der Bandscheibe eine wichtige Rolle spielen [106,150,211]. Aus ersten tierexperimentellen Traumamodellen konnte Anhaltspunkte für eine Rolle der

posttraumatisch nachweisbaren inflammatorischen Reaktion für resultierende intradiskale Veränderungen abgeleitet werden [95,96].

Bei der hinsichtlich des posttraumatischen Korrekturverlustes in den Focus des Interesses gerückten Bandscheibe handelt es sich um ein viskoelastisches System [55], dessen Funktion auf molekularer Ebene an die strukturelle Integrität der extrazellulären Matrix, die regelrechte Funktion der intradiskalen Zellen, das physiologische Gleichgewicht der verschiedenen Matrixproteine und dem davon abhängigem Wassergehalt gebunden ist [12]. Veränderungen dieser Homöostase führen zu einem beschleunigten Alterungsprozess mit konsekutiver Degeneration. Dabei spielen sowohl genetische [11,101,105,178,209] als auch mechanische [4,5,6] und biochemischen Veränderungen [32,67], die sich wiederum gegenseitig beeinflussen können, eine Rolle.

Es konnte gezeigt werden, dass unphysiologische und über das normale Maß hinausgehende Belastungen einer der Hauptgründe für die Degeneration der Bandscheibe und damit für die sekundären degenerativen Prozesse im gesamten Bewegungssegment nach Junghans sind [6]. Hier konnten unter anderem eine Reduktion der Zellzahl, eine Verminderung der Syntheserate von Kollagen Typ-II, eine Reduktion der Proteoglykansynthese und eine Anstieg Matrix degradierender Enzyme wie verschiedener MMP`s gezeigt werden [2,78,91,123,130,133]. Unter unphysiologischen mechanischen Bedingungen wurden weiterhin eine erhöhte Apoptoserate und ein Anstieg kataboler Mediatoren, wie NO, nachgewiesen [123,130,133]. Im Gefolge all dieser Veränderungen kommt es zu einer verminderten Wasserbindungsfähigkeit, damit zu einer Verschlechterung der Ernährungssituation der intradiskalen Zellen und durch die resultierende Veränderung in der Synthese der extrazellulären Matrix zu einer Störung der mechanischen Integrität [3,55,155].

Auch in Traumamodellen von Bandscheiben konnten inflammatorische Reaktionen nachgewiesen werden, im weiteren Verlauf ergaben sich in diesen Modellen daraus resultierend morphologische Veränderungen, wie sie für degenerative Bandscheiben typisch sind [10,95,96,159]. Während für die Bandscheibendegeneration bereits klare Daten vorhanden sind, die die Infiltration inflammatorischer Zellen in die

Bandscheibe und eine gestörte Zellbalance beschreiben [88,131,137,155,212], ist die Datenlage für posttraumatische Veränderungen unzureichend [74,95,96,98,159]. Ein besonderes Augenmerk wurde daher in der von uns vorgestellten Studie mit humanem Gewebe darauf verwendet, nicht nur Untersuchungen an Bandscheiben von Patienten mit Wirbelkörperfrakturen allein durchzuführen, sondern zwei wichtige Kontrollgruppen (gesunde Bandscheibe, degenerativ veränderte Bandscheibe) diesen gegenüberzustellen. In den meisten humanen Studien fehlen zumindest eine oder beide Kontrollgruppen [34,106,160,161]. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass natürlich auch die Kontrollgruppe „gesunde Bandscheibe“ von Patienten mit Wirbelkörperpathologien stammen, eine Degeneration der Bandscheibe aber durch das präoperativ durchgeführte MRT ausgeschlossen werden konnte. Die gleichzeitige Untersuchung von Patienten mit degenerativ veränderten Bandscheiben erlaubte zusätzlich einen Vergleich hinsichtlich der Intensität immunologischer Veränderungen zwischen Trauma und Degeneration bei gleichen Laborbedingungen.

In einem ersten Schritt wurden die Bandscheibenpräparate aller drei Gruppen auf die Infiltration inflammatorischer Zellen hin untersucht. Die Ergebnisse zeigten in den Bandscheiben von Patienten mit Wirbelsäulentrauma eine Infiltration vor allem von neutrophilen Granulozyten, aber auch von Monozyten/Makrophagen und CD3 positiven T-Zellen bzw. zytotoxischen T-Lymphozyten. Eine ähnliche, aber weniger intensive Migration inflammatorischer Zellen konnte in degenerativ veränderten Bandscheiben gezeigt werden, wohingegen inflammatorische Zellen in den gesunden Bandscheiben, bis auf vereinzelte neutrophile Granulozyten, nicht nachweisbar waren.

Die Ergebnisse dieser Studie sind vergleichbar mit den publizierten Daten früherer Studien bei degenerativ veränderten Bandscheiben [106,150,211], sowie zwei tierexperimentellen Studien mit einem Traumamodell [74,98], wobei diese Studien vor allem die Phänotypisierung von Lymphozytensubpopulationen bzw. Monozyten/Makrophagen untersuchten. Sowohl in Bandscheibensequestern, als auch in protrusioniertem Bandscheibengewebe wurden verschiedenste Immunzellen

nachgewiesen. So konnten CD68-positive Makrophagen, CD25-positive aktivierte Lymphozyten, CD22-positive B-Zellen und Mastzellen in degenerativ veränderten Bandscheiben immunhistochemisch detektiert werden [45,75,143,150,156,211,217]. In tierexperimentellen Traumamodellen konnten CD3-positive Lymphozyten und CD68-positive Makrophagen nachgewiesen werden [74,98]. Auf die zentrale Rolle der angeführten Zellen hinsichtlich der Degradation der extrazellulären Matrix unter anderem über die Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren sowie durch ihre chemotaktischen und phagozytotischen Eigenschaften wird von verschiedenen Autoren in diesem Zusammenhang hingewiesen [143,150,156,212].

Die vorgestellte Studie zeigt, dass sowohl CD-3 positive als auch Perforin positive T-Lymphozyten als auch PGM-1 (CD68) und Ber-Mac3 (CD163) positive Makrophagen in Bandscheibengewebe von degenerativen und auch von traumatisierten Bandscheiben nachweisbar waren. Beide Gruppen waren bezüglich der Zellzahl allerdings in deutlich geringerem Ausmaß als CD66 positive neutrophile Granulozyten nachweisbar. Dies ist von Bedeutung, da letztere durch die Freisetzung von Proteasen und O₂-Radikalen ein hohes autodestruktives Potential aufweisen, das bei überschießender Freisetzung oder verlängerter Lebenszeit der neutrophilen Granulozyten zu erheblichen lokalen Gewebeerstörungen führen kann. Insbesondere die Matrixsynthese wird gehemmt, während die Matrixdegradation beschleunigt wird [46,177]. Inwieweit die primär physiologische Infiltration neutrophiler Granulozyten durch regulatorische Immunzellen über die Freisetzung Apoptose regulierender Zytokine in der verletzten Bandscheibe kontrolliert wird, ist derzeit unklar. Da sich die inflammatorische Reaktion in der traumatisierten Bandscheibe aber ähnlich wie eine klassische Entzündungsreaktion verhält, kann vermutet werden, dass auch in der verletzten Bandscheibe Proteasen und O₂-Radikale zu einer sekundären Destruktion der Bandscheibe beitragen könnten [18,53,74,98,214].

Die Bedeutung infiltrierender T-Lymphozyten und Makrophagen für die Bandscheibendegeneration ist schwer zu interpretieren und nicht komplett klar. Ob aktivierte Makrophagen an der Resorption von zerstörtem Bandscheibengewebe beteiligt sind und gegebenenfalls von lokalen T-Lymphozyten-Subpopulationen

reguliert werden, erfordert weitere Untersuchungen. Das bei degenerative Prozessen inflammatorische Zellen nachgewiesen werden konnten, wurde schon gezeigt [88,131,137,155,212]. Sie spielen sowohl bei der Beeinflussung der Matrixsynthese im Sinne einer Reduktion und Veränderung der Zusammensetzung als auch bei der durch Proteasen vermittelten Matrixdegeneration durch die aus den Entzündungszellen freigesetzten Zytokinen eine Rolle [46,177]. Die aufgezeigte Infiltration mit Perforin positiven zytotoxischen T- Zellen ist insofern von besonderem Interesse, da bekannt ist, dass diese Zellen an der Auslösung von Apoptose der antigentragenden Zielzellen beteiligt sind [74,98,176].

Eine Schlüsselrolle für das körpereigene Abwehrsystem hat das Komplementsystem inne, das nicht nur der Elimination von eindringenden Bakterien, sondern auch an „Abräumprozessen“ von Zelldebris beteiligt ist. Das Komplementsystem ist als Teil der körpereigenen Abwehr an der Chemotaxis, der Expression von Adhäsionsmolekülen und an der Phagozytose sowie Zellyse direkt oder indirekt beteiligt [142,146]. Um zu untersuchen, ob die Traumatisierung von Bandscheibengewebe zu einer Aktivierung der Komplementkaskade führt, wurden die zentralen Komplementfaktoren C3c (als stabiles C3- Fragment) und C5b untersucht. Es handelt sich hierbei um gewebeständige Faktoren, die im Gegensatz zu den Anaphylatoxinen C3a und C5a bei stattgefunderer Aktivierung im Gewebe sicher nachweisbar sind. Weiterhin wurden alle Schnitte auf den MAC/C5b-9 als Endprodukt der Komplementkaskade hin untersucht.

Erwartungsgemäß waren weder C3c und C5b, noch MAC/C5b-9 in gesunden Bandscheiben nachweisbar. In degenerativ veränderten Bandscheiben ließen sich sowohl C3c, C5b als auch MAC/C5b-9 detektieren. In der Traumagruppe konnte sowohl für die Mediatoren C3c und C5b als auch für das Endprodukt der Komplementkaskade, den MAC/C5b-9, eine regelmäßige und zum Teil intensive Deposition nachgewiesen werden. Hieraus wird deutlich, dass parallel zur spezifischen und unspezifischen zellulären Immunität auch die Komplementkaskade aktiviert wird. Die Intensität der untersuchten Faktoren war ähnlich wie bei der Infiltration von Immunzellen in der Gruppe der traumatisierten Bandscheiben höher

als bei degenerativ veränderten Bandscheiben.

Eine Analyse hinsichtlich der Bedeutung dieser Ergebnisse ist schwierig, da bis zum heutigen Tag lediglich eine Publikation zu diesem Thema existiert. Grönblad et. al [63] konnten den MAC/C5b-9 in degenerierten Bandscheiben und in hernierten Bandscheibenanteilen im Vergleich zu gesundem Bandscheibengewebe nachweisen. Die Autoren heben dabei die direkt die Zellwand schädigende Wirkung des MAC/C5b-9 hervor, der damit zum Gewebeuntergang in dem geschädigten Bereich beitragen könnte. Daten und Publikationen für die traumatisierte Bandscheibe sind ansonsten nicht einmal für tierexperimentelle Studien existent.

Es kann allerdings vermutet werden, dass auch die Aktivierung der Komplementkaskade, ähnlich der massiven Infiltration von neutrophilen Granulozyten, einen negativen Einfluss auf die Reparationsvorgänge unter Beteiligung der Chondrozyten aufweist und die Matrixdegradation fördert. Wegen der in anderen Publikationen nachgewiesenen Präsenz von Antigen-Antikörperkomplexen in degenerativ verändertem Bandscheibengewebe ist eine Aktivierung der Komplementkaskade über den klassischen Weg wahrscheinlich [73,179,188].

Neben der Aktivierung der Komplementkaskade mit ihrem autodestruktiven Potential erschienen in den letzten zehn Jahren Publikationen, die einen weiteren autodestruktiven Pathway, den programmierten Zelltod (Apoptose), als Ursache für die Bandscheibendegeneration verantwortlich machten [15,64,67,115,168]. Die Apoptose stellt einen physiologischen Prozess dar, der dazu führt, senile Zellen aus dem Körper zu entfernen, ohne dass dabei toxische Metabolite aus den apoptotischen Zellen freigesetzt werden. Hierbei existiert für alle Zellen eine Homöostase, die auf einem Gleichgewicht zwischen der Bereitstellung von juvenilen Zellen und der Beseitigung seniler Zellen besteht. Wird dieses Gleichgewicht zugunsten der Apoptose verschoben, führt dies insbesondere für Organzellen zu einer massiven Funktionseinschränkung des betroffenen Organs. Im Fall der Bandscheibe würde dies bedeuten, dass eine erhöhte Rate von apoptotischen Chondrozyten die Regenerationsfähigkeit der Bandscheibe empfindlich stören würde. Dies ist für degenerativ veränderte Bandscheiben wegen der durch die

Apoptose bedingten Reduktion der Zellzahl und der daraus resultierenden Störung der Gewebemöostase beschrieben [15,64,115,168]. Es bleibt noch anzumerken, dass die Apoptose von Zellen ein sehr kurzlebiger Prozess ist, der innerhalb weniger Stunden abläuft. Gelingt der Nachweis von apoptotischen Zellen in einem Gewebe, bedeutet dies für die in vivo Situation eine hohe Rate [160]. Deshalb sind in gesundem Bandscheibengewebe keine apoptotischen Zellen nachweisbar. Hier sind die Ergebnisse dieser Studie identisch mit früheren Studien [168].

Es gibt, wie schon oben erwähnt, eine Reihe von Studien, die zeigen, dass apoptotische Prozesse im Rahmen der Bandscheibendegeneration eine wichtige Rolle spielen [13,15,34,160,168]. So konnten verschiedenen Arbeitsgruppen zeigen, dass eine nachweisbare Apoptose durch mechanischen Stress induziert werden kann [15,123,130,133]. Daher lag die Annahme nahe, dass ein massives einmaliges mechanisches Trauma ebenfalls zu einer Aktivierung apoptotischer Prozesse führen müsste. Um eine optimale Vergleichbarkeit der Daten zu erhalten und unsere Daten mit Ergebnissen aus der Literatur vergleichen zu können, wurden in diesem Teilprojekt ebenfalls degenerativ veränderte Bandscheiben mit Bandscheiben von Patienten mit Wirbelkörperfrakturen verglichen.

Die Wirbelkörperfraktur führte zu einem massiven Anstieg apoptotischer intradiskaler Zellen. Während auch in degenerativ veränderten Bandscheiben apoptotische Zellen, wenn auch deutlich seltener, nachweisbar waren, konnte keine Apoptose in gesunden Bandscheiben gefunden werden. Die Ergebnisse dieser Studie stimmen somit mit früheren Studien [13,15,34,160,168] überein, was die degenerativ veränderte Bandscheibe betrifft. Hingegen ist es uns zum ersten Mal gelungen, Apoptose in traumatisch destruiertem Bandscheibengewebe nachzuweisen. Wie für die anderen Untersuchungen (Infiltration von Immunzellen, Aktivierung der Komplementkaskade) zeigt sich die höchste Apoptoserate in traumatisierten Bandscheiben, während die Apoptose in degenerativ veränderten Bandscheiben deutlich geringer ausfällt.

Bei genauer Betrachtung der Daten fällt auf, dass die Anzahl apoptotischer Zellen,

vor allem in der traumatisierten Bandscheibe, deutlich höher liegt als die Anzahl von Chondrozyten. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass nicht nur Chondrozyten, sondern auch infiltrierende Immunzellen durch apoptotische Prozesse eliminiert werden. Eine exakte Analyse, welche Zellen besonders von der Apoptose betroffen sind, ist schwierig, da Doppelfärbungen für apoptotische Zellen technisch kaum durchführbar sind. Es konnte in dieser Studie jedoch anhand von HE- Färbungen des zu untersuchenden Bandscheibengewebes unter Nutzung deskriptiver morphologischer Kriterien (fehlende Kernanfärbbarkeit, Eosinophilie) der eindeutige Nachweis für die Apoptose von Chondrozyten in den Bandscheiben der Traumagruppe erbracht werden.

Der Nachweis apoptotischer Zellen im Bandscheibengewebe mittels der TUNEL-Färbung als Übersichtsfärbung ist Standard [64,67,115]. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass die TUNEL-Färbung auch nekrotische Zellen im Spätstadium anfärbt [15]. Deshalb wurden neben den oben genannten histomorphologischen Färbungen in weiteren Schritten die Aktivierungswege der Apoptose sowohl für eine detaillierte Untersuchung derselben als auch für einen weiteren Nachweis für die Aktivierung der Apoptose selbst analysiert. Die Aktivierung der Apoptose kann bekanntlich über verschiedene Wege erfolgen. Hierbei spielen die Caspasen sowohl im Aktivierungsprozess („inducer/initiator caspases“) als auch im finalen Schritt der Apoptose („executioner caspases“) die entscheidende Rolle.

Die Analyse der „executioner caspases“ 3 und 7 (3/7) zeigte sowohl in der degenerativen Gruppe als auch in der Traumagruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung der Aktivität. Die Aktivität der Caspasen 3/7 war in traumatisch veränderten Bandscheiben niedriger als in degenerativ veränderten Bandscheiben, ohne dass hier eine statistische Signifikanz nachzuweisen war.

Um die intrazellulären Aktivierungswege weiter zu spezifizieren, wurde anschließend die Aktivität der Initiator-Caspasen 8 und 9 gemessen. Es war das Ziel, eine

Aussage darüber zu erhalten, welcher der beiden Pathways, der extrinsische Rezeptor vermittelte Weg (Caspase 8) oder der intrinsische mitochondrial vermittelte Weg (Caspase 9), aktiviert werden. Die Messung der Caspase 8 ergab eine in der degenerativen Gruppe und in der Traumagruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte Aktivität. Der Unterschied zwischen der degenerativen Gruppe und der Traumagruppe war nicht signifikant. Ein vergleichbares Ergebnis ergaben die Messungen für Caspase 9. Sowohl in der degenerativen als auch in der Traumagruppe zeigte sich eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte Aktivität.

Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass das Wirbelsäulen-/Bandscheibentrauma beide Pathways aktiviert. Im Gegensatz zu anderen untersuchten Parametern ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich mit degenerativ veränderten Bandscheiben. Unsere Ergebnisse bezüglich der degenerativ veränderten Bandscheibe sind im Konsens mit früheren Untersuchungen, in denen die Hochregulierung der Effektor-Caspase 3 ebenso wie die Hochregulierung und vermehrte Synthese der Initiator-Caspase 9 als Bestandteil des intrinsischen mitochondrial vermittelten Aktivierungsweges gezeigt werden konnten [8,160,161,162,168]. Hingegen zeigen unsere Ergebnisse auch eine vermehrte Aktivität der Initiator-Caspase 8 als Bestandteil des extrinsischen Aktivierungsweges, die bisher noch nicht in der Literatur beschrieben wurde. In der Literatur finden sich vor allem Hinweise auf eine Aktivierung über den intrinsischen mitochondrial vermittelten Weg [160,161,162,168].

Die extrinsisch vermittelte Aktivierung der Apoptose verläuft über die Bindung von löslichen Proteinen an die entsprechenden Rezeptoren („death receptors“). Deshalb wurde in einem nächsten Arbeitsschritt die Genexpression der wichtigsten Rezeptoren Fas und TNF-R1 untersucht. Beide Rezeptoren waren sowohl in der Traumagruppe, als auch in der degenerativen Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Die Messung der mRNA-Expression von TNF- α zeigte eine signifikante Hochregulation in der Traumagruppe ohne Veränderung in der degenerativen Gruppe, während die Ergebnisse bezüglich des Fas-Liganden ein

genau umgekehrtes Ergebnis erbrachten.

Diese Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse der TUNEL-Färbungen und des Nachweises der Apoptose anhand histomorphologischer Parameter dahingehend, dass „unphysiologische“ Apoptose in der Tat sowohl in den verletzten, als auch in den degenerativ veränderten Bandscheiben präsent ist. Allerdings scheinen bei der Rezeptor-induzierten Apoptose Unterschiede zwischen beiden Gruppen zu bestehen. Während die Rezeptor-vermittelte Apoptose nach Trauma vor allem über TNF- α induziert wird, spielt dies bei der Degeneration der Bandscheibe keine Rolle. Hingegen scheint die Apoptose bei letzterer vornehmlich über Fas/FasL aktiviert zu sein. Eine Studie von Seguin et al. [182] zeigte, dass TNF- α bereits in sehr niedrigen Konzentrationen die Genexpression von Metalloproteinasen, die ihrerseits Proteoglykane eliminieren können, inhibiert. Da TNF- α nach Gewebetrauma in der Regel als eines der ersten Zytokine innerhalb von Minuten in hohen Konzentrationen von Makrophagen synthetisiert und freigesetzt wird, scheint beim Wirbelsäulentrauma der TNF-R1 vermittelte extrinsische Pathway eine wichtige Rolle zu spielen. Die Ergebnisse für die degenerativ veränderte Bandscheibe sind in Übereinstimmung mit früheren Studien [34,160,161,162]. Da es sich bei der Bandscheibendegeneration um einen chronischen Prozess über viele Jahre handelt, war nicht zu erwarten, dass ein klassisches proinflammatorisches Zytokin wie TNF- α eine wesentliche Rolle spielt. Von Park et al. [162] konnte gezeigt werden, dass über den Fas- Rezeptor vermittelt auch der intrinsische Weg der Apoptose in degenerativ veränderten Zellen aktiviert werden kann. Dies erfolgt über eine Caspase 8-Aktivierung, die nicht zu einer Signalübertragung entsprechend der extrinsischen Kaskade, sondern über den BID zu einer Deaktivierung von Bcl-2 führt und damit zur Initiierung der Apoptose über den mitochondrial vermittelten Weg. Unsere Ergebnisse geben ebenfalls eindeutig Hinweise darauf, dass in chronischen degenerativen Prozessen der Fas/FasL und nicht der TNF- α /TNF-R1 vermittelte Signalweg von Bedeutung ist.

Ein überraschendes Ergebnis zeigten die immunhistochemischen Untersuchungen des Fas-Rezeptors. Während der Fas-Rezeptor sowohl in der Kontrollgruppe, als

auch in der Gruppe degenerativ veränderter Bandscheiben nachweisbar war, ließ sich in der Traumagruppe keine Expression des Rezeptors im Gewebe nachweisen. Allerdings fanden sich reichlich positive Zellen in den Gewebespalten. Diese Zellen entsprechen migrierten Zellen, wahrscheinlich Immunzellen.

Um Informationen über eine mögliche Beteiligung des intrinsischen Pathway zu erhalten, wurde die Expression des pro-apoptotischen Bax und des anti-apoptotischen Bcl-2 untersucht. Das pro-apoptotische Bax zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Hingegen war die Expression des anti-apoptotischen Bcl-2 in der Traumagruppe im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen signifikant erniedrigt. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde das Protein Bcl-2 zusätzlich immunhistochemisch untersucht. Während Bcl-2 auf Schnitten der Kontrollgruppe und der degenerativen Gruppe deutlich nachweisbar war, konnte in traumatisierten Bandscheiben kein Bcl-2 nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse gehen konform mit den Ergebnissen der mRNA-Analysen und bestätigen, dass der intrinsische mitochondriale Signalweg nach einem Wirbelsäulentrauma in intradiskalen Zellen aktiviert wird.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das schwere Wirbelsäulentrauma massive inflammatorische Reaktionen innerhalb der Bandscheibe auslöst. Die Verletzung aktiviert sowohl die unspezifische, als auch die spezifische Immunität, wobei der unspezifischen Immunität mit ihrem hohen autodestruktiven Potential eine besondere Bedeutung beikommen könnte. Ein weiterer autodestruktiver Mechanismus ist die Dysbalance des programmierten Zelltodes (Apoptose), der eine Vielzahl von Immunzellen, aber auch eindeutig nachweisbar die intradiskalen Chondrozyten erfasst, sodass vermutet werden kann, dass reparative und regenerative Prozesse dadurch eingeschränkt sind. Inwieweit überschießende inflammatorische Reaktionen die Degeneration der Bandscheibe nach Trauma beschleunigen oder nach Rekonstruktion verbleibende mechanische Fehlbelastungen chronische Entzündungsprozesse begünstigen, muss Gegenstand zukünftiger Forschungsprojekte sein.

10. Zusammenfassung

Ein zentrales Problem nach Frakturen im Bereich der thorakolumbalen Wirbelsäule ist der sowohl nach konservativer als auch nach operativer Behandlung im Verlauf auftretende Korrekturverlust, der nicht nur im betroffenen Wirbelkörper, sondern vor allem in den angrenzenden Bandscheiben stattfindet. Aus Untersuchungen der Degeneration von Bandscheiben ist bekannt, dass beim Prozess der Degeneration sowohl eine lokale Entzündungsreaktion als auch Apoptose eine zentrale Rolle spielt. Damit stellte sich die Frage, ob auch in einmaliges und schweres Trauma, welches zu Frakturen der an die Bandscheibe angrenzenden Wirbel führt, in der Lage ist, zu intradiskalen Veränderungen zu führen, wie sie aus degenerativen Bandscheiben bekannt sind.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden Bandscheiben von Patienten mit Wirbelkörperfrakturen, welche im Rahmen der operativen Versorgung ohnehin entnommen werden mussten, auf posttraumatische inflammatorische Reaktionen (Migration von Entzündungszellen, Aktivierung der Komplementkaskade) und auf Apoptose und deren Aktivierungswege hin untersucht. Als Vergleichsgruppe wurden operativ zu versorgende Patienten mit degenerativ bedingten Pathologien der Wirbelsäule und als Kontrollgruppe gesunde Bandscheiben von Patienten, bei denen der angrenzende Wirbelkörper entfernt werden musste, verwendet.

Dabei konnten in Bandscheiben aus der Traumagruppe regelmässig CD66-positive neutrophile Granulozyten, T-Lymphozyten (CD3-positive- und Perforin-positive zytotoxische-T-Lymphozyten) und Makrophagen (CD68-positive und CD163-positive Makrophagen) ebenso wie zentrale Mediatoren der Komplementkaskade (C3c, C5b und der MAC/C5b-9) nachgewiesen werden. Ebenso konnte regelhaft die Caspase-vermittelte Apoptose ortständiger intradiskaler Zellen in der Traumagruppe nachgewiesen werden. Die Analyse der Pathways der Apoptose zeigte eine Aktivierung über den intrinsischen mitochondrial vermittelten Weg und Hinweise für eine Aktivierung über den extrinsischen Rezeptor vermittelten Weg.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass in Bandscheiben, die an frakturierte Wirbelkörper angrenzen, eine posttraumatische Entzündungsreaktion ausgelöst und Apoptose hervorgerufen wird. Es kommt zur Migration einer Reihe verschiedener

Entzündungszellen und zur Aktivierung von Bestandteilen der Komplementkaskade. Weiterhin lässt sich Caspase vermittelte Apoptose sowohl über den extrinsischen (Rezeptor vermittelt) als auch über den intrinsischen (mitochondrial vermittelt) Weg aktiviert, nachweisen. Damit konnte erstmalig gezeigt werden, dass ein einmaliges und schweres Trauma zu intradiskalen inflammatorischen Reaktionen und zur Apoptose intradiskaler Zellen führt.

11. Literatur

1. Abel R, Gerner HJ, Smit C, Meiners T. Residual deformity of the spinal canal in patients with traumatic paraplegia and secondary changes of the spinal cord. *Spinal Cord* 1999, 37: 4- 19
2. Adam HH, Lotz JC. Prolonged spinal loading induces matrix metalloproteinase-2 activation in intervertebral discs. *Spine* 2003, 28: 1781- 1788
3. Adams MA, McNally DS, Dolan P. "Stress" distributions inside intervertebral discs. The effect of age and degeneration. *J Bone Joint Surg* 1996, 78- Br : 965- 972
4. Adams MA, Dolan P. Could sudden increases in physical activity causes degeneration of intervertebral discs? *Lancet* 1997, 350: 734- 735
5. Adams MA, Freeman BJC, Morrison HP, Nelson IW, Dolan P. Mechanical initiation of intervertebral disc degeneration. *Spine* 2000, 25: 1625- 1636
6. Adams MA, Dolan P. Perspective. Spine biomechanics. *Journal of Biomechanics* 2005, 38: 1972- 1983
7. Agus H, Kayah C, Arslantas M. Nonoperative treatment of burst-type thoracolumbar vertebral fractures: clinical and radiological results of 29 patients. *Eur Spine J* 2005, 14: 536- 540
8. Ahsan R, Tajima N, Chosa E, Sugamata M, Sumida M, Hamada M. Biochemical and morphological changes in herniated human intervertebral disc. *J Orthop Sci* 2001, 6: 510- 518
9. Alanay A, Acaroglu E, Yazici M, Oznur A, Surat A. Short- segment pedicle instrumentation of thoracolumbar burst fractures: does transpedicular intracorporeal grafting prevent early failure? *Spine* 2001, 26: 213- 217
10. Anderson DG, Izzo MW, Hall DJ, Vaccaro AR, Hilibrand A, Arnold W, Tuan RS, Albert TJ. Comparative gene expression profiling of normal and degenerative discs. *Spine* 2002, 27: 1291- 1296
11. Annunen S, Paassilta P, Lohiniva J, Perälä M, Pihlajamaa T, Karppinen J, Tervonen O, Kröger H, Lähde S, Vanharanta H, Ryhänen L, Göring HHH, Ott J, Prockop DJ, Ala-Kokko L. An allele of COL9A2 associated with intervertebral disc degeneration. *Science* 1999, 285: 409- 412

12. Antoniou J, Steffen T, Nelson F, Winterbottom N, Hollander AP, Poole AR, Aebi M, Alini M. The human lumbar intervertebral disc. Evidence of changes in the biosynthesis and degeneration of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing and degeneration. *J Clin Invest* 1996, 98: 996- 1003
13. Ariga K, Miyamoto S, Nakase T, Okuda S, Meng W, Yonenobu K, Yoshikawa H. The relationship between apoptosis of endplate chondrocytes and aging and degeneration of the intervertebral disc. *Spine* 2001, 26: 2414- 2420
14. Ariga K, Yonenobu K, Nakase t, Kaneko M, Okuda S, Uchiyama Y, Yoshikawa H. Localization of cathepsins D, K, and L in degenerated human intervertebral discs. *Spine* 2001, 26: 2666- 2672
15. Ariga K, Yonenobu K, Nakase T, Hosono N, Okuda S, Meng W, Tamura Y, Yoshikawa H. Mechanical stress-induced apoptosis of endplate chondrocytes in organ-cultured mouse intervertebral disc. *Spine* 2003, 28: 1528- 1533
16. Arner EC, Pratta MA, Trzaskos JM, Decicco CP, Tortorella MD. Generation and characterization of aggrecanase. *J Biol Chem* 1999, 274: 6594- 6601
17. Ayala A, Lomas JL, Grutkoski PS, Chung CS. Fas-Ligand mediated apoptosis in severe sepsis and shock. *Scand J Infect Dis* 2003, 35: 593- 600
18. Backé E, Schwarting R, Gerdes J, Ernst M, Stein H. Ber-Mac3: new monoclonal antibody that defines human monocyte/macrophage differentiation antigen. *J Clin Pathol* 1991, 44: 936- 945
19. Been HD, Bouma GJ. Comparison of two types of surgery for thoraco-lumbar burst fractures: combined anterior and posterior stabilisation vs. posterior instrumentation only. *Acta Neurochir (Wien)* 1999, 141: 349- 356
20. Bibby SRS, Jones DA, Ripley RM, Urban JPG. Metabolism of the intervertebral disc: Effects of low levels of oxygen, glucose, and pH on rates of energy metabolism of bovine nucleus pulposus cells. *Spine* 2005, 30: 487- 496
21. Bidère N, Senik A. Caspase-independent apoptotic pathways in T lymphocytes: A minireview. *Apoptosis* 2001, 6: 371- 375
22. Blauth M, Tscherne H, Gotzen L, Haas N. Ergebnisse verschiedener Operationsverfahren zur Behandlung frischer Brust- und Lendenwirbelsäulenverletzungen. *Unfallchirurg* 1987, 90: 260- 273
23. Blauth M, Knop C, Bastian L. Brust- und Lendenwirbelsäule. In: Tscherne H, Blauth M (Hrsg.) *Tscherne Unfallchirurgie- Wirbelsäule*. 1998, Springer Berlin, Heidelberg

24. Böhler L. Die Technik der Knochenbruchbehandlung. 1929 Maudrich, Wien
25. Böhler L. Konservative Behandlung von Brüchen der Brust- und Lendenwirbelsäule. Unfallmed Berufskh 1972, 65: 100- 104
26. Böhm H, Harms J, Donk R, Zielke K. Correction and stabilization of angular kyphosis. Clin Orthop 1990, 258: 56- 61
27. Bras M, Queenan B, Susin SA. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. Biochemistry (Moscow) 2005, 70: 284- 293
28. Buckwalter JA. Fine structural studies of the human intervertebral disc. In: White AA, Gordon SL (Hrsg.) Idiopathic low back pain. 1982, CV Mosby, St Louis
29. Buckwalter JA. Spine Update. Aging and degeneration of the human intervertebral disc. Spine 1995, 20: 1307- 1324
30. Bühren V. Verletzungen der Brust- und Lendenwirbelsäule. Unfallchirurg 2003, 106: 55- 69
31. Callaghan JP, McGill SM. Intervertebral disc herniation: studies on porcine model exposed to highly repetitive flexion/extension motion with compressive force. Clinical Biomechanics 2001, 16: 28- 37
32. Carreon LY, Ito T, Uchiyama S, Takahashi H, Ikuta F. Histologic changes in the disc after cervical spine trauma: evidence of disc absorption. J Spinal Disord 1996, 4: 313- 316
33. Cassinelli EH, Hall RA, Kang JD. Biochemistry of intervertebral disc degeneration and the potential for gene therapy applications. Spine J 2001, 1: 205- 214
34. Chen B, Fellenberg J, Wang H, Carstens C, Richter W. Occurrence and regional distribution of apoptosis in scoliotic discs. Spine 2005, 30: 519- 524
35. Chou W, Hsu C, Chang W, Wong C. Adjacent segment degeneration after lumbar spinal posterolateral fusion with instrumentation in elderly patients. Arch Orthop Trauma Surg 2002, 122: 39- 43
36. Court C, Colliou OK, Chin JR, Liebenberg E, Bradford DS, Lotz JC. The effect of static in vivo bending on the murine intervertebral disc. Spine J 2001, 1: 239- 245
37. Crean JKG, Roberts S, Jaffray DC, Eisenstein SM, Duance VC. Matrix metalloproteinases in the human intervertebral disc: Role in disc degeneration and scoliosis. Spine 1997, 22: 2877- 2884

38. Cripton PA, Jain GM, Wittenberg RH, Nolte LP. Load-shearing characteristics of stabilized lumbar spine segments. *Spine* 2000, 25: 170- 179
39. Daniaux H. Technik und erste Ergebnisse der transpedikulären Spongiosaplastik bei Kompressionsbrüchen im Lendenwirbelbereich. *Acta Chir Austr (Suppl)* 1982, 43: 79
40. Daniaux H. Transpedikuläre Reposition und Spongiosaplastik bei Wirbelkörperbrüchen der unteren Brust- und Lendenwirbelsäule. *Unfallchirurg* 1986, 89: 197- 213
41. Daniaux H, Seykora P, Genelin A, Lang T, Kathrein A. Application of posterior plating and modifications in thoracolumbar spine injuries. *Spine* 1991, 16: 882- 900
42. Daniaux H, Wagner M, Kathrein A, Lang T. Frakturen des thorakolumbalen Übergangs. Die konservative Behandlung. *Orthopäde* 1999, 28: 682- 691
43. Denis F, Armstrong GWD, Searls K, Matta L. Acute thoracolumbar burst fractures in the absence of neurologic deficit: a comparison between operative and non operative treatment. *Clin Orthop Relat Res* 1984, 189: 142- 149
44. Dick W. Fixateur interne. State of the art reviews. *Spine* 1992, 6: 147- 172
45. Doita M, Kanatani T, Harada T, Mizuno K. Immunhistologic study of the ruptured intervertebral disc of the lumbar spine. *Spine* 1996, 21: 235- 241
46. Doita M, Kanatani T, Ozaki T, Matsui N, Kurosaka M, Yoshiya S. Influence of macrophage infiltration of herniated disc tissue on the production of matrix metalloproteinases leading to disc resorption. *Spine* 2001, 26: 1522- 1527
47. Esses SI, Botsford DJ, Kostuik JP. Evaluation of surgical treatment for burst fractures. *Spine* 1990, 15: 667- 673
48. Etebar S, Cahill DW. Risk factors for adjacent-segment failure following lumbar fixation with rigid instrumentation for degenerative instability. *J Neurosurg (Spine)* 1999, 90: 163- 169
49. Eyre D, Muir H. Types I and Types II collagens in intervertebral disc. Interchanging radial distributions in annulus fibrosus. *Biochem J* 1976, 157: 257- 270
50. Eyre D, Muir H. Quantitative analysis of type I and II collagens in human intervertebral discs at various ages. *Biochim Biophys Acta* 1977, 492: 29- 42
51. Eysel P, Rompe JD, Hopf C, Meinig G. Die Bedeutung der Bandscheibe für den Repositionsverlust operativ stabilisierter Frakturen der Rumpfwirbelsäule. *Unfallchirurg* 1994, 97: 451- 457

52. Eysel P, Hopf C, Fürderer S. Kyphotische Deformierungen bei Frakturen der Brust- und Lendenwirbelsäule. *Orthopäde* 2001, 30: 955- 964
53. Falini B, Flenghi L, Pileri S, Gambacorta M, Bigerna B, Durkop H, Eitelbach F, Thiele J, Pacini R, Cavaliere A. PG-M1: a new monoclonal antibody directed against a fixative- resistant epitope on the macrophage-restricted form of the CD68 molecule. *Am J Pathol* 1993, 142: 1359- 1372
54. Feil J, Wörsdorfer O. Ventrale Stabilisierung im Bereich der Brust- und Lendenwirbelsäule. *Chirurg* 1992, 63: 856- 865
55. Ferguson SJ, Steffen T. Biomechanics of the aging spine. *Eur Spine J* 2003, 12 (Suppl): 97- 103
56. Ferguson SJ, Ito K, Nolte LP. Fluid flow and convective transport of solutes within the intervertebral disc. *Journal of Biomechanics* 2004, 37: 213- 221
57. Fürderer S, Wenda K, Thiem N, Hachenberger R, Eysel P. Traumatic intervertebral disc lesion- magnetic resonance imaging as a criterion for or against intervertebral fusion. *Eur Spine J* 2001, 10: 154- 163
58. Gardner VO, Armstrong GWD. Long term lumbar facet joint changes in spinal fracture patients treated with Harrington rods. *Spine* 1990, 15: 479- 484
59. Gertzbein SD. Scoliosis Research Society. Multicenter spine fracture study. *Spine* 1992, 17: 528- 540
60. Gertzbein SD, Betz R, Clements D, Errico T, Hammerberg K, Robbins S, Shepherd E, Weber A, Kerina M, Albin J, Wolk D. Semirigid instrumentation in the management of lumbar spine conditions combined with circumferential fusion. A multicenter study. *Spine* 1996, 21: 1918- 1926
61. Goupille P, Jayson MIV, Valat JP, Freemont AJ. Matrix metalloproteinases: The clue to intervertebral disc degeneration? *Spine* 1998, 23: 1612- 1626
62. Grönblad M, Virri J, Tolonen J, Seitsalo S, Kaapa E, Kankare J, Myllynen P, Karaharju EO. A controlled immunohistochemical study of inflammatory cells in disc herniation tissue. *Spine* 1994, 19: 2744- 2751
63. Grönblad M, Habtemariam A, Virri J, Seitsalo S, Vanharanta H, Guyer RD. Complement membrane attack complexes in pathologic disc tissue. *Spine* 2003, 28: 114- 118
64. Gruber HE, Hanley E. Analysis of aging and degeneration of the human intervertebral disc: Comparison of surgical specimen with normal controls. *Spine* 1998, 23: 751- 757

65. Gruber HE, Norton J, Hanley E. Anti-apoptotic effects of IGF-1 and PDGF on human intervertebral disc cells in vitro. *Spine* 2000, 25: 2153- 2157
66. Gruber HE, Hanley E. Ultrastructure of the human intervertebral disc during aging and degeneration. Comparison of surgical and control specimen. *Spine* 2002, 27: 798- 805
67. Gruber HE, Hanley EN. Recent advances in disc cell biology. *Spine* 2003, 28: 186- 193
68. Gruber HE, Ingram JA, Hanley EN. Immunolocalization of MMP-19 in the human intervertebral disc: implications for disc aging and degeneration. *Biotech Histochem* 2005, 80: 157- 162
69. Guilak F, Ting-Beall HP, Baer AE, Trickey WR, Erickson GR, Setton LA. Viscoelastic properties of intervertebral disc cells: Identification of two biomechanically distinct cell populations. *Spine* 1999, 24: 2475- 2483
70. Guiot BH, Fessler RG. Molecular biology of degenerative disc disease. *Neurosurgery* 2000, 47: 1034- 1040
71. Gumpenberg von S, Vieweg J, Claudi B, Harms J. Die primäre Versorgung der frischen Verletzungen der Brust- und Lendenwirbelsäule. *Akt Traumatol* 1991, 21: 265- 273
72. Haas N, Blauth M, Tscherne H. Anterior plating in thoracolumbar spine injuries. Indication, technique and results. *Spine* 1991, 16 (Suppl): 100- 111
73. Habtemariam A, Grönblad M, Virri J, Seitsalo S, Ruuskanen M, Karaharju E. Immunocytochemical localization of immunoglobulins in disc herniations. *Spine* 1996, 16: 1864- 1869
74. Habtemariam A, Virri J, Grönblad M, Holm S, Kaigle A, Karaharju E. Inflammatory cells in full-thickness annulus injury in pigs: an experimental disc herniation animal model. *Spine* 1998, 23: 524- 529
75. Habtemariam A, Virri J, Grönblad M, Seitsalo S, Karaharju E. The role of mast cells in disc herniation inflammation. *Spine* 1999, 24: 1516- 1520
76. Hadjipavlou AG, Simmons JW, Yang JP, Bi L, Simmons DJ, Necessary JT. Torsional injury resulting in disc degeneration in the rabbit: II. Associative changes in dorsal root ganglion and spinal cord neurotransmitter production. *J Spinal Disord* 1998, 11: 318- 321
77. Hampton D, Laros G, McCarron R, Franks D. Healing potential of the annulus fibrosus. *Spine* 1989, 14: 398- 401

78. Handa T, Ishihara H, Ohshima H, Osada R, Tsuji H, Obata K. Effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis and matrix metalloproteinase production in the human lumbar intervertebral disc. *Spine* 1997, 22: 1085- 1091
79. Harms J, Stoltze D. The indications and principles of correction of posttraumatic deformities. *Eur Spine J* 1992, 1: 142- 151
80. Harms J, Tabasso G. *Instrumented Spinal Surgery*. 1999 Thieme, Stuttgart New York
81. Hastreiter D, Ozuna RM, Spector M. Regional variations in certain cellular characteristics in human lumbar intervertebral discs, including the presence of α -smooth muscle actin. *J Orthop Res* 2001, 19: 597- 604
82. Hayes AJ, Benjamin M, Ralphs RR. Extracellular matrix in development of degenerative disc disease. *Matrix Biol* 2001, 20: 107- 121
83. Heyde CE, Ertel W, Kayser R. Die Versorgung von Wirbelsäulenverletzungen beim Polytrauma. *Orthopäde* 2005, 34: 889- 905
84. Heyde CE, Tschöke K, Hellmuth M, Hostmann A, Ertel W, Oberholzer A. Trauma induces apoptosis in human thoracolumbar intervertebral discs. *BMC Clinical Pathology* 2006, 6:5
85. Hollander AP, Heathfield TF, Liu JJ, Pidoux I, Roughly PJ, Mort JS, Poole AR. Enhanced denaturation of the α 1 (II) chains of type II collagen in normal adult human intervertebral discs compared to femoral articular cartilage. *J Orthop Res* 1996, 14: 61- 66
86. Horner HA, Urban JPG. 2001 Volvo award winner in basic science studies: Effect of nutrient supply on the viability of cells from the nucleus pulposus of the intervertebral disc. *Spine* 2001, 26: 2543- 2549
87. Hutton WC, Toribatake Y, Elmer WA, Ganey TM, Tomita K, Whitesides TE. The effect of compressive force applied to the intervertebral disc in vivo: a study of proteoglycans and collagen. *Spine* 1998, 23: 2524- 2537
88. Iatridis JC, Mente PL, Stokes AF, Aronsson DD, Alini MA. Compression-induced changes in intervertebral disc properties in a rat tail model. *Spine* 1999, 24: 996- 1002
89. Inui Y, Nishida K, Doita M, Takada T, Miyamoto H, Yoshiya S, Kurosaka M. Fas-Ligand expression on nucleus pulposus begins in developing embryo. *Spine* 2004, 29: 2365- 2369
90. Ishihara H, Tsuji H, Hirano N, Ohshima H, Terahata N. Effects of continuous quantitative vibration on rheologic and biological behaviours of the intervertebral disc. *Spine* 1992, 17 (Suppl): 7- 12

91. Ishihara H, McNally DS, Urban JPG, Hall AC. Effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis in different regions of the intervertebral disc. *J Appl Physiol* 1996, 80: 839- 846
92. James KS, Wenger KH, Schlegel JD, Dunn HK. Biomechanical evaluation of the stability of thoraco-lumbar burst fractures. *Spine* 1994, 19: 1731- 1740
93. Junghans H. Die funktionelle Pathologie der Zwischenwirbelscheibe. *Langenbecks Arch Chir* 1951, 267: 393- 398
94. Johnstone B, Bayliss MT. The large proteoglycans of the human intervertebral disc. *Spine* 1995, 20: 674- 684
95. Kääpä E, Holm S, Han X, Takala T, Kovanen V, Vanharanta H. Collagens in the injured porcine intervertebral disc. *J Orthop Res* 1994, 12: 93- 102
96. Kääpä E, Holm S, Inkinen R, Lammi MJ, Tammi M, Vanharanta H. Proteoglycan chemistry in experimentally injured porcine intervertebral disk. *J Spinal Disord* 1994, 7: 296- 306
97. Kanemoto M, Hukuda S, Komiya Y, Katsuura A, Nishioka J. Immunohistochemical study of matrix metalloproteinase-3 and tissue-inhibitor of metalloproteinase-1 in human intervertebral discs. *Spine* 1996, 21: 1098- 1104
98. Kanerva A, Kommonen B, Grönblad M, Tolonen J, Habtemariam A, Virri J, Karahaju E. Inflammatory cells in experimental intervertebral disc injury. *Spine* 1997: 2711- 2715
99. Kang JD, Georgescu HI, McIntyre-Larkin L, Stefanovic-Racic M, Donaldson WF, Evans CH. Herniated lumbar intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin-6, and prostaglandin E2. *Spine* 1996, 21: 271- 277
100. Kang JD, Stefanovic-Racic M, McIntyre LA, Georgescu HI, Evans CH. Toward a biomechanical understanding of human intervertebral disc degeneration and herniation: Contributions of nitric oxide, interleukins, prostaglandin E2, and matrix metalloproteinases. *Spine* 1997, 22: 1065- 1073
101. Karppinen J, Pääkkö E, Räänä S, Tervonen O, Kurunlahti M, Nieminen P, Alakokko L, Malmivaara A, Vanharanta H. Magnetic resonance imaging findings in relation to the COL9A2 tryptophan allele among patients with sciatica. *Spine* 2002, 27: 78- 82
102. Kato T, Haro H, Komori H, Shinomiya K. Sequential dynamics of inflammatory cytokine, angiogenesis inducing factor and matrix degrading enzymes during spontaneous resorption of the herniated disc. *J Orthop Res* 2004, 22: 859- 900

103. Katscher S, Verheyden P, Gonschorek O, Glasmacher S, Josten C. Thorakolumbale Wirbelfrakturen nach konservativer und operativer Behandlung. *Unfallchirurg* 2003, 106: 20- 27
104. Katthagen BD, Rehn J. Formveränderungen von Wirbelfrakturen im Röntgenbild unter frühfunktioneller Therapie. *Hefte Unfallheilkd* 1980, 149: 139- 146
105. Kawaguchi Y, Osada R, Kanemori M, Ishihara H, Ohmori K, Matsui H, Kimura T. Association between an aggrecan gene polymorphism and lumbar disc degeneration. *Spine* 1999, 24: 2456- 2460
106. Kawaguchi S, Yamashita T, Yokogushi K, Muramaki T, Ohwada O, Sato N. Immunophenotypic analysis of the inflammatory infiltrates in herniated intervertebral discs. *Spine* 2001, 26: 1209- 1214
107. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972, 26: 239- 257
108. Kertulla LI, Serlo WS, Tervonen OA, Paakkko EL, Vanharanta HV. Post traumatic findings of the spine after earlier vertebral fracture in young patients: clinical and MRI study. *Spine* 25: 1104- 1108
109. Kiechle FL, Zhang X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clinica Chimica Acta* 2002, 326: 27- 45
110. Kilgore KS, Shen JP, Miller BF, Ward PA, Warren JS. Enhancement by the complement membrane attack complex of tumor necrosis factor- α -induced endothelial cell expression of E-selectin and ICAM-1. *J Immunol* 1995, 155: 1434- 1441
111. Knop C, Blauth M, Bastian L, Lange U, Kesting J, Tscherne H. Frakturen der thorakolumbalen Wirbelsäule. *Unfallchirurg* 1997, 100: 630- 639
112. Knop C, Blauth M, Bühren V, Hax PM, Kinzl L, Mutschler M, Pommer A, Ulrich C, Wagner S, Weckbach A, Wentzensen A, Wörsdörfer O. Operative Behandlung von Verletzungen des thorakolumbalen Überganges. *Unfallchirurg* 1999, 102: 924- 935
113. Knop C, Blauth M, Bühren V, Hax PM, Kinzl L, Mutschler M, Pommer A, Ulrich C, Wagner S, Weckbach A, Wentzensen A, Wörsdörfer O. Operative Behandlung von Verletzungen des thorakolumbalen Überganges. *Unfallchirurg* 2000, 103: 1032- 1047
114. Knop C, Fabian HF, Bastian L, Blauth M. Late results of thoracolumbar fractures after posterior instrumentation and bone grafting. *Spine* 2001, 26: 88- 99

115. Kohyama K, Saura R, Doita M, Mizuno K. Intervertebral disc cell apoptosis by nitric oxide: biological understanding of intervertebral disc degeneration. *Kobe J med Sci* 2000, 46: 283- 295
116. Kossmann T, Payne B, Stahel PF, Trentz O. Traumatische Querschnittslähmung. Operative Maßnahmen. *Schweiz Med Wochenschr* 2000, 130: 816- 828
117. Kostuik JP. Anterior fixation of burst fractures of the thoracic and lumbar spine with or without neurological involvement. *Spine* 1988, 13: 286- 293
118. Krämer J. Degenerative Wirbelsäulenerkrankungen. In: Krämer J (Hrsg.) *Orthopädie und Orthopädische Chirurgie: Wirbelsäule und Thorax*, 2004, Thieme Stuttgart New York
119. Krismer M. *Die Rotation der Brust- und Lendenwirbelsäule*. H. Huber, Bern
120. Krismer M, Haid C, Rabl W. The contribution of anulus fibers to torque resistance. *Spine* 1996, 22: 2551- 2557
121. Krismer M, Haid C, Behensky H, Kapfinger P, Landauer F, Rachbauer F. Motion in lumbar functional spine units during side bending and axial rotation moments depending on the degree of degeneration. *Spine* 2000, 25: 2020- 2027
122. Kröber MW, Unglaub F, Wang H, Schmid C, Thomsen M, Nerlich A, Richter W. New in vivo animal model to create intervertebral disc degeneration and to investigate the effect of therapeutic strategies to stimulate disc regeneration. *Spine* 2002, 27: 2684- 2690
123. Kröber M, Unglaub F, Guehring T, Nerlich A, Hadi T, Lotz J, Carstens C. Effects of controlled dynamic disc distraction on degenerated intervertebral discs. *Spine* 2005, 30: 181- 187
124. Kummer B. Biomechanische Aspekte zur Instabilität der Wirbelsäule. In: Fuchs GA, (Hrsg.) *Die instabile Wirbelsäule*. 1991, Thieme Stuttgart
125. Kummer B. *Anatomie der Wirbelsäule*. In: von Strempel A (Hrsg.) *Die Wirbelsäule*. 2001, Thieme Stuttgart New York
126. Kuner EH, Kern W, Schlickewei W. Zur funktionellen Behandlung von Wirbelfrakturen am thoraco-lumbalen Übergang mit dem Drei-Punkt-Korsett. *Hefte Unfallheilkd* 1980, 149: 153- 160
127. Liljenqvist U, Mommsen U. Die operative Behandlung thorakolumbalen Wirbelsäulenverletzungen mit dem Fixateur interne und transpedikulärer Spongiosaplastik. *Unfallchirurg* 1995, 98: 30- 39

128. Lin MR, Panjabi MM, Oxland TR. Functional radiographs of acute thoracolumbar burst fracture. *Spine* 1993, 16: 140- 145
129. Lindsey RW, Dick W. The fixateur interne in the reduction and stabilization of thoracolumbar spine fractures in patients with neurologic deficit. *Spine* 1991, 16: 140- 145
130. Liu J, Roughly PJ, Mort JS. Identification of human intervertebral disc stromelysin and its involvement in matrix degradation. *J Orthop Res* 1991, 9: 568- 575
131. Liu GZ, Ishihara H, Osada R, Kimura T, Tsuji H. Nitric oxide mediates the change of proteoglycan synthesis in the human lumbar intervertebral disc in response to hydrostatic pressure. *Spine* 2001, 26: 134- 141
132. Lob A. Die Wirbelsäulenverletzung und ihre Ausheilung. 1954 Thieme, Stuttgart
133. Lotz JC, Colliou OK, Chin JR, Duncan NA, Liebenberg E. 1998 Volvo Award Winner in biomechanical studies: Compression- induced degeneration of the intervertebral disc: an in vivo mouse model and finite-elemente study. *Spine* 1998, 2493- 2506
134. Lotz JC, Chin JR. Intervertebral disc cell death is depending on the magnitude and duration of spinal loading. *Spine* 2000, 25: 1477- 1483
135. Lotz JC. Animal models of intervertebral disc degeneration. Lessons learned. *Spine* 2004, 29: 2742- 2750
136. Lu YM, Hutton WC, Gharpuray VM. Can variations in disc height affect the mechanical function of the disc? *Spine* 1996, 21: 2208- 2216
137. MacLean JJ, Lee CR, Alini M, Iatridis JC. The effect of short-term load duration on anabolic and catabolic gene expression in the rat tail intervertebral disc. *J Orthop Res* 2005, 23: 1120- 1127
138. Magerl F, Aebi M, Gerzbein SB, Harms J, Nazarian S. A comprehensive classification of thoracic and lumbar spine injuries. *Eur Spine J* 1994, 3: 184- 201
139. Magnus G. Die Behandlung und Begutachtung des Wirbelbruchs. *Arch Orthop Unfallchir* 1930, 29: 277- 283
140. Magnus G. Zur Behandlung der Wirbelbrüche. *Arch Klin Chir* 1938, 191: 547- 556

141. Malcolm BW, Bradford DS, Winter RB, Chou SN. Posttraumatic kyphosis: A review of forty-eight surgically treated patients. *J Bone Joint Surg* 1981, 63-Am; 891- 899
142. Mastellos D, Lambris JD. Complement: more than a "guard" against invading pathogens? *Trends in Immunology* 2002, 23: 485- 491
143. Matsui Y, Maeda M, Nakagami W, Wakao MD, Iwata H. The involvement of matrix metalloproteinases and inflammation in lumbar disc herniation. *Spine* 1998, 23: 863- 868
144. Matthis W, Biedermann L. Biomechanical analysis of the load shearing principle using TSRH and the Moss-device. Posterexhibition. Int. Meeting on Advanced Spine Techniques, 1994, München
145. McLain RF, Benson DR. Urgent surgical stabilization of spinal fractures in polytraumatized patients. *Spine* 1999, 24: 1646- 1654
146. Mollnes TE, Song WC, Lambris JD. Complement in inflammatory tissue damage and disease. *Trends in Immunology* 2002, 23: 61- 64
147. Nachemson A, Elfström G. Intravital dynamic pressure measurements in lumbar discs. *Scand J Rehabil Med* 1970, 14 (Suppl): 1- 40
148. Nagano T, Yonenobu K, Miyamoto S, Tohyama, Ono K. Distribution of the basic fibroblast growth factor and its receptor gene expression in normal and degenerated rat intervertebral disc. *Spine* 1995, 20: 1972- 1978
149. Natarjan RN, Ke JH, Andersson GBJ. A model to study the disc degeneration. *Spine* 1994, 19: 259- 265
150. Nerlich AG, Weiler C, Zipperer J, Narozny M, Boos N. Immunolocalization of phagocytic cells in normal and degenerated intervertebral discs. *Spine* 2002, 27: 2484- 2490
151. Niedhard FU. Das Sinterungsverhalten von Wirbelkörperfrakturen bei Behandlung mit dem Drei-Punkt-Korsett. *Aktuel Traumatol* 1985, 15: 159- 164
152. Niedhard FU, Pfeil J. *Orthopädie* 1989, Hippokrates Stuttgart
153. Norcross JA, Lester GE, Weinhold P, Dahners LE. An in vivo model of degenerative disc disease. *J Orthop Res* 2003, 21: 183- 188
154. Oberholzer C, Oberholzer A, Clare-Salzler M, Moldawer LL. Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. *FASEB J* 2001, 15: 879- 892

155. Ohshima H, Urban JP, Bergel DH. Effect of static load on matrix synthesis rates in the intervertebral disc measured in vitro by a new perfusion technique. *J Orthop Res* 1995, 13: 22- 29
156. Olmarker K, Blomquist J, Stromberg J, Nannmark U, Thomsen P, Rydevik B. Inflammatogenic properties of nucleus pulposus. *Spine* 1995, 20: 665- 669
157. Oner FC, Rijt RR, Ramos LMP, Dhert WJA, Verbout AJ. Changes in the disc space after fractures of the thoracolumbar spine. *J Bone Joint Surg* 1998, 80-Br: 833- 839
158. Osada R, Ohshima H, Ishihara H, Yudoh K, Sakai K, Matsui H, Tsuji H. Autocrine/paracrine mechanism of insulin-like growth factor-1 secretin, and the effect of insulin-like growth factor-1 on proteoglycan synthesis in bovine intervertebral discs. *J Orthop Res* 1996, 14 : 690- 699
159. Osti OL, Vernon-Roberts B, Fraser RD. Anulus tears and intervertebral disc degeneration: An experimental study using an animal model. *Spine* 1990, 15: 762- 767
160. Park JB, Chang H, Kim KW. Expression of Fas ligands and apoptosis of disc cells in herniated lumbar disc tissue. *Spine* 2001, 26: 618- 621
161. Park JB, Kim KW, Han CW, Chang H. Expression of Fas receptor on disc cells in herniated lumbar disc tissue. *Spine* 2001, 26: 142- 146
162. Park JB, Lee JK, Park SJ, Kim KW, Riew KD. Mitochondrial involvement in Fas-mediated apoptosis of human lumbar disc cells. *J Bone Joint Surg* 2005, 87-A: 1338- 1342
163. Patel RV, DeLong W Jr, Vresilovic EJ. Evaluation and treatment of spinal injuries in the patient with polytrauma. *Clin Orthop* 2004, 422: 43- 55
164. Pearce RH, Beverley JG, Adams ME. Degeneration and the chemical composition of the human intervertebral disc. *J Orthop Res* 1987, 5: 198- 205
165. Pearce RH, Mathieson JM, Mort JS, Roughly PJ. Effect of age on the abundance and fragmentation of link protein of the human intervertebral disc. *J Orthop Res* 1989, 7: 861- 867
166. Pfirrmann CWA, Metzdorf A, Zanetti M, Hodler J, Boos N. Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine* 2001, 26: 1873- 1878
167. Polly DW Jr, Klemme WR, Shawen S. Management options for the treatment of posttraumatic thoracic kyphosis. *Semin Spine Surg* 2000, 12: 110- 116

168. Rannou F, Lee TS, Zhou RH, Chin J, Lotz J, Mayoux-Benhamou MA, Barbat JP, Chevrot A, Shyy JYJ. Intervertebral disc degeneration: The role of the mitochondrial pathway in annulus fibrosus cell apoptosis induced by overload. *Am J Pathol* 2001, 164: 915- 924
169. Reed JC. Mechanism of apoptosis. *Am J Pathol* 2000, 157: 1415- 1430
170. Reinhold M; Knop C, Lange U, Bastian L, Blauth M. Nichtoperative Behandlung von Verletzungen der thorakolumbalen Wirbelsäule. *Unfallchirurg* 2003, 106: 566- 576
171. Resch H, Rabl M, Klampfer H, Ritter E, Povacz P. Operative vs. Konservative Behandlung von Frakturen des thorakolumbalen Übergangs. *Unfallchirurg* 2000, 103: 281- 288
172. Roaf R. A study of the mechanics of spinal injury. *J Bone Joint Surg* 1960, 42-Br: 810- 823
173. Roberts S, Caterson B, Menage J, Evans H, Jaffray DC, Eisenstein SM. Matrix metalloproteinases and aggrecanase. *Spine* 2000, 25: 3005- 3013
174. Rudert M, Tillmann B. Histochemischer und immunhistochemischer Nachweis von Blut- und Lymphgefäßen im Diskus intervertebralis des Menschen. *Ann Ant* 1993, 175: 237
175. Rudig L, Runkel M, Kreitner KF, Seidel T, Degreif J. Kernspintomographische Untersuchung thorakolumbalen Wirbelfrakturen nach Fixateur-interne-Stabilisierung. *Unfallchirurg* 1997, 100: 524- 530
176. Rüdiger T, Zettl A, Adam P, Bonzheim I, Geissinger E, Müller-Hermelink HK. Periphere NK/T-Zell-Lymphome. *Pathologie* 2007, 28: 55- 58
177. Sakuma M, Fujii N, Takahshi T, Hoshino J, Satoshi M, Hisashi I. Effect of chondroitinase ABC on matrix metalloproteinases and inflammatory mediators produced by intervertebral disc of rabbit in vitro. *Spine* 2002, 27: 576- 580
178. Sambrook PN, MacGregor AJ, Spector TD. Genetic influences on cervical and lumbar disc degeneration: a magnetic resonance imaging study in twins. *Arthritis Rheum* 1999, 42: 366- 372
179. Satoh K, Konno S, Nishiyama K, Olmarker K, Kikuchi S. Presence and distribution of antigen-antibody-complexes in the herniated nucleus pulposus. *Spine* 1999, 24: 1980- 1984
180. Schlegel JD, Smith J, Schleusener RL. Lumbar motion segment pathology adjacent to thoracolumbar, lumbar, and lumbosacral fusions. *Spine* 1996, 21: 970- 981

181. Schnee CL, Ansell LV. Selectin criteria and outcome of operative approaches for thoracolumbar burst fractures with and without neurological deficit. *J Neurosurg* 1987, 86: 48- 55
182. Séguin CA, Pilliar RM, Roughley PJ, Kandel RA. Tumor necrosis factor α modulates matrix production and catabolism in nucleus pulposus tissue. *Spine* 2005, 30: 1940- 1948
183. Shinmei M, Kikuchi T, Yamagishi M, Shimomura Y. The role of interleukin-1 on proteoglycan metabolism of rabbit anulus fibrosus cells cultured in vitro. *Spine* 1988, 13: 1284- 1290
184. Shono Y, McAfee PC, Cunningham BW. Experimental study of thoracolumbar burst fractures. A radiographic and biomechanical analysis of anterior and posterior instrumentation systems. *Spine* 1994, 19: 1711- 1720
185. Singh K, Vaccaro AR, Eichenbaum MD, Fitzhenry LN. Invited Review: The surgical management of thoracolumbar injuries. *J Spinal Cord Med* 2003, 24: 95- 101
186. Skuginna A, Hierholzer G, Ludolph E. Funktionelle Behandlungen bei Frakturen der Brust- und Lendenwirbelsäule. *Hefte Unfallheilkd* 1980, 149: 129- 138
187. Speth MJGM, Oner FC, Kadic MAC, deKlerk LWL, Verbout AJ. Recurrent kyphosis after posterior stabilization of thoracolumbar fractures. *Acta Orthop Scand* 1995, 66: 406- 410
188. Spiliopoulou I, Korovessis P, Konstantinou D, Dimitracopoulous G. IgG and IgM concentration in the prolapsed human intervertebral disc and sciatica etiology. *Spine* 1994, 15: 1320- 1322
189. Stahel PF, Kariya K, Shohami E, Barnum SR, Eugster HP, Trentz O, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC. Intracerebral complement C5a receptor (CD88) expression is regulated by TNF and lymphotoxin- α following closed head injury in mice. *Journal of Neuroimmunology* 2000, 109: 164- 172
190. Steffen R, Wittenberg RH, Nolte LP, Hedtmann A, Kolditz D, Herchenbach T. Experimentelle Untersuchungen zur Drehpunktveränderung des Bewegungssegmentes nach Bandscheibenausräumung. *Z Orthop* 1991, 129: 248- 254
191. Steffen R, Nolte LP, Jergas M, Krämer J. Einfluß von Weichteilverletzungen auf die Biomechanik sagittal symmetrischer thorakolumbalen Wirbelkompressionsfrakturen. *Akt Traumatol* 1993, 23: 90- 96

192. Steindl A, Schuh G. Spätergebnisse nach Lendenwirbelfraktur mit konservativer Behandlung nach Lorenz Böhler. *Unfallchirurg* 1992, 95: 439-444
193. Stoltze D, Harms J. Kombinierte Stabilisationsverfahren an der thorakolumbalen Wirbelsäule. *Osteosynth Intern* 1998, 6: 157- 171
194. Stoltze D, Harms J. Korrekturen posttraumatischer Fehlstellungen. *Orthopäde* 1999, 28: 731- 745
195. Sztrolovics R, Alini M, Roughley PJ, Mort JS. Aggrecan degradation in human intervertebral disc and articular cartilage. *Biochem J* 1997, 326: 235- 241
196. Taipale J, Saharinen J, Hedman K, Keski-Oja J. Latent transforming growth factor-[beta]1 and its binding protein are components of extracellular matrix microfibrils. *J Histochem Cytochem* 1996, 44: 875- 879
197. Takada T, Nishida K, Doita M, Kurosaka M. Fas ligand exists in intervertebral disc cells: A potential molecular mechanism for immune privilege of the disc. *Spine* 2002, 27: 1526- 1530
198. Takahashi T, Kurihara H, Nakajima S, Kato T, Matsuzaka S, Sekiguchi T, Onaya M, Miyauchi S, Mizuno S, Horie K, Fujita Y, Hirose T. Chemonucleolytic effects of chondroitinase ABC on normal rabbit intervertebral disc. Course of action up to 10 days postinjection and minimum effective dose. *Spine* 1996, 21: 2405- 2411
199. Terahata N, Ishihara H, Ohshima H, Hirano N, Tsuji H. Effects of axial traction stress on soluble transport and proteoglycan synthesis in the porcine intervertebral disc in vitro. *Eur Spine J* 1994, 3: 325- 330
200. Terti M, Paajanen H, Laato M, Aho H, Komu M, Kormano M. Disc degeneration in magnetic resonance imaging. A comparative biomechanical, histologic, and radiologic study in cadaver spines. *Spine* 1991, 16: 629- 634
201. Tiedjen K, Müller KM. Pathologie der degenerativen Wirbelsäulenerkrankungen. 1998, Springer Berlin, Heidelberg, New York
202. Tillmann B, Rudert M. Struktur und Funktion des Discus intervertebralis. In: Noack W (Hrsg.). *Praktische Orthopädie*, 28. Die Bandscheibe. 1994, Thieme Stuttgart New York
203. Tortorella MD, Pratta M, Liu RQ, Austin J, Ross OH, Abbaszade I, Burn T, Arner E. Sites of aggrecan cleavage by recombinant human aggrecanase-1 (ADAMTS-4). *J Biol Chem* 2000, 275: 18566- 18573
204. Trojan E. Langfristige Ergebnisse von 200 Wirbelbrüchen der Brust/Lendenwirbelsäule ohne Lähmung. *Unfallmed Berufskrankh* 65: 122- 134

205. Trout JJ, Buckwalter JA, Moore KC, Landis SK. Ultrastructure of human intervertebral disc. I. Changes in notochordal cells with age. *Tissue Cell* 1982, 14: 359- 369
206. Vaccaro AR, Silber FS. Post-traumatic spinal deformity. *Spine* 2001, 26 (Suppl): 111- 118
207. Van der Roer N, de Lange ES, Bakker FC, de Vet HC, van Tulder MW. Management of traumatic thoracolumbar fractures: a systemic review of the literature. *Eur Spine J* 2005, 14: 527- 534
208. Verlaan JJ, Diekerhof CH, Buskens E, Tweel van der I, Verbout AJ, Dhert WJA, Oner FC. Surgical treatment of traumatic fractures of the thoracic and lumbar spine: a systemic review of the literature on techniques, complications, and outcome. *Spine* 2004, 29: 803- 814
209. Videman T, Leppävuori J, Kaprio J, Battié MC, Gibbons LE, Peltonen L, Koskenvuo M. 1998 Volvo award winner in basic science studies: Intragenic polymorphism of the vitamin D receptor gene associated with intervertebral disc degeneration. *Spine* 1998, 23: 2477- 2485
210. Virri J, Grönblad M, Tolonen J, Setsalo S, Ruuskanen M, Karaharju EO. Immunocytochemical analysis of lymphocytes in disc herniation. Presented at the annual meeting of the international society for the study of the lumbar spine. June 18- 22. 1995, Helsinki, Finland
211. Virri J, Grönblad M, Seitsalo S, Habtemariam A, Kääpä E, Karaharju E. Comparison of the prevalence of inflammatory cells in subtypes of disc herniations and associated with straight leg raising. *Spine* 2001, 23: 2311- 2315
212. Walsh AJL, Lotz JC. Biological response of the intervertebral disc to dynamic loading. *Journal of Biomechanics* 2004, 37: 329- 337
213. Weinstein JN, Collato P, Lehmann T. Thoracolumbar “burst” fractures treated conservatively: a long- term follow- up. *Spine* 1988: 13: 33- 38
214. Wesche DE, Lomas-Neira JL, Perl M, Chung CS, Ayala A. Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. *J Leukoc Biol* 2005, 78: 325- 337
215. White AA, Panjabi MM. *Clinical biomechanics of the spine*. 2nd. edn. 1990 Lippincott-Raven, Philadelphia New York
216. Whitesides TE. Traumatic kyphosis of the thoracolumbar spine. *Clin Orthop* 1977, 128: 78- 92

217. Woertgen C, Rothoerl RD, Brawanski A. Influence of macrophage infiltration of herniated lumbar disc tissue on outcome of lumbar surgery. *Spine* 2000, 25: 871- 875
218. Wolter D, Kortmann HR. Transpedikuläre Spondylodese der Brust- und Lendenwirbelsäulenverletzung. *Chirurg* 1992, 63: 866- 874
219. Woltmann A, Weiss B, Matrens B, Broli R, Krüger S, Bruch HP. Morphologic parameters for quantitative determination of inflammatory activity of the peritoneum. *Langenbecks Arch Surg* 1997, 382: 231- 236
220. Yakubi S. Basic and update knowledge of intervertebral disc herniation. Review. *Fukushima J Med Sci* 1999, 45: 63- 75
221. Yaszemski MJ, White AA, Panjabi MM. Biomechanics of the spine. In: Fardon DF, Garfin SR. Orthopaedic knowledge update. *Spine* 2, 2002 American Academy of Orthopaedic Surgeons, Rosemont
222. Young JD, Young TM. Channel fluctuations induced by membrane attack complex C5B-9. *Mol Immunol* 1990, 27: 1001- 1007
223. Zdeblick TA, Warden KE, Zou D, McAfee PC, Abitbol JJ. Anterior spinal fixators. A biomechanical in vitro study. *Spine* 1993, 18: 513- 521

12. Danksagung

Es ist mir ein Bedürfnis, meinen Familienmitgliedern, Freunden, medizinischen Lehrern und Kollegen zu danken.

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. W. Ertel für die umfassende Unterstützung bei der Erarbeitung der Thematik, die Beratung in fachlichen Fragen und die für die Ausführung der Arbeit geschaffenen Möglichkeiten.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. U. Weber für die Beratung in fachlichen Fragen, die Motivation und die engagierte Unterstützung bei der Lösung organisatorischer Aufgaben.

Meinem orthopädischen Lehrer Herrn Chefarzt i.R. Dr. med. D. Jungmichel möchte ich für die umfassende Ausbildung und die Hinführung zur Wirbelsäulenchirurgie danken. Die von Dr. med. D. Jungmichel vorgelebte Herangehensweise an fachliche Probleme und sein Engagement für den Beruf waren für mich prägend.

Herrn Prof. Dr. med. C. Melzer möchte ich für seine Beratung in beruflichen und fachlichen Fragen, Herrn Prof. Dr. med. R.H. Gahr für die Erweiterung meines unfallchirurgischen Spektrums, Herrn Chefarzt i.R. Dr. med. J. Heidel für die Förderung meiner notfallmedizinischen Ambitionen und Herrn Chefarzt Dr. med. H. Böhm für die umfassende Ausbildung auf wirbelsäulenchirurgischem Gebiet danken.

Für die Ausführung eines solchen Projektes sind Kooperationen und gegenseitige Unterstützung notwendig. Danken möchte ich hier besonders meinen Kollegen PD Dr. med. P.F. Stahel, PD Dr. med. A. Oberholzer und PD Dr. med. R. Kayser. Die fachliche Beratung, die logistische Unterstützung und die Bereitstellung von Laborkapazität durch Philip Stahel und Andreas Oberholzer sowie die gemeinsame Arbeit sind nicht hoch genug einzuschätzen. Die Motivation und freundschaftliche Unterstützung durch Philip Stahel war beispielhaft. Ralph Kayser ist als Kollege, Freund und Partner vieler Projekte eine treibende Kraft unseres über lange Strecken gemeinsamen Werdeganges.

Dem Laborteam der Arbeitsgruppe Oberholzer: Arwed Hostmann, Markus Hellmuth,

Marion Lemke und Tatjana Gust möchte ich für die umfassende Unterstützung und Hilfe ebenso danken wie dem Laborteam der Arbeitsgruppe Stahel: Iris Leinhase und Claudia Conradt. Prof. Anagnostopoulos und seinem Team möchte ich für die Unterstützung bei der Erstellung und Auswertung eines Teils der histologischen Schnitte danken. Unserer Doktorantin Nina Axnick gebührt Dank für ihr Engagement bei der Untersuchung eines Teils der posttraumatischen Entzündungsreaktion.

Für Ihre ständiges Interesse und ihre Motivation möchte ich mich sowohl bei meinen beiden „großen“ Kindern Stephanie und Marcus Christoph als auch bei meinem kleinen Sohn Louis Christoph, der in derZeit der Erstellung der Arbeit viel auf seinen Vater verzichten musste, bedanken.

Danken möchte ich besonders meinen Eltern Brigitte und Dr. Christoph Peter Heyde. Beide haben mich auf all meinen Wegen immer fürsorglich, motivierend und beratend begleitet. Weiterhin bedanken möchte ich mich meinem Vater für die Mühen bei der Korrektur der Arbeit.

Der größte Dank gebührt meiner lieben, geduldigen und mich über lange Jahre in allen Belangen unterstützenden und vor allem immer wieder motivierenden Frau Kathrin. Ohne ihre Hilfe und Unterstützung in allen Bereichen des täglichen privaten und beruflichen Lebens wäre die Erstellung dieser Arbeit nicht denkbar gewesen.

13. Erklärung entsprechend Anlage 2 der Habitationsordnung

Erklärung

4 § Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegt Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habitationsordnung bekannt ist.

.....
Datum

.....
Unterschrift

14. Anhang

Informationsblatt ([Anhang 1](#)) und Einverständniserklärung ([Anhang 2](#)) für Patienten umseitig.

Zentrum für spezielle Chirurgie des Stütz – und Bewegungsapparates
Klinik für Unfall – und Wiederherstellungschirurgie
Charite – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
Direktor: Prof. Dr. med. W. Ertel

Informationsblatt für Patienten

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

Ziel jeder medizinischen Behandlung ist es, dem Patienten optimal zu helfen und möglichst den Langzeiterfolg einer Behandlung zu sichern. Bei verschiedenen Verletzungen und Erkrankungen der Wirbelsäule sind heute bewährte Therapien etabliert. Trotzdem ist es das Ziel medizinischer Forschung, die therapeutischen Möglichkeiten zu verbessern. Ziele sind hier z. B. eine Verkleinerung des operativen Eingriffes bei einer erforderlichen Operation oder die Entwicklung medikamentöser Therapien, um ein operatives Trauma zu minimieren oder idealer Weise zu vermeiden.

Wenig bekannt ist das Verhalten der Bandscheibe an der Wirbelsäule nach Verletzungen (Frakturen) und bei Erkrankungen (abnutzungsbedingt oder entzündlich) der Wirbelsäule.

Bei dem bei Ihnen vorgesehenen operativen Eingriff an der Wirbelsäule muss die Bandscheibe entfernt werden. Normalerweise wird eine so entfernte Bandscheibe verworfen.

Die Untersuchung einer solchen Bandscheibe auf entzündliche und immunologische Veränderungen kann jedoch Hinweise auf den Langzeitverlauf der Veränderungen in einer so geschädigten Bandscheibe geben. An dem gewonnenen Bandscheibenmaterial, welches sonst verworfen wird, lassen sich durch die Untersuchung der Entzündungsaktivität und der immunologischen Reaktion in der Bandscheibe solche Rückschlüsse gewinnen.

Unsere Arbeitsgruppe untersucht während der Operation entnommenen Bandscheiben auf abgelaufene entzündliche und immunologische Aktivitäten, indem die Bandscheiben auf das Vorhandensein spezifischer Zellen, Eiweiße und genetischer Informationen (über die Produktion spezifischer Eiweiße) untersucht werden.

Daraus lassen sich Hinweise auf den weiteren Verlauf der Erkrankung und ggf. Ansatzpunkte für eine therapeutische Beeinflussung dieser Prozesse ableiten.

Wir möchten auf diesem Weg dazu beitragen, mehr über den Verlauf dieser Erkrankungen zu erfahren und die Möglichkeiten einer therapeutischen Beeinflussung dieser Prozesse zu analysieren.

Wir möchten Sie deshalb bitten, die Bandscheibe, welche während der Operation entnommen werden muss und normalerweise verworfen wird, für unsere Untersuchungen frei zu geben. Alle bei dieser Untersuchung gewonnenen Daten werden verschlüsselt behandelt und vertraulich ausschließlich für die Forschung verwendet.

Zentrum für spezielle Chirurgie des Stütz – und Bewegungsapparates
Klinik für Unfall – und Wiederherstellungschirurgie
Charite – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
Direktor: Prof. Dr. med. W. Ertel

Einverständniserklärung

Über die Ziele und die Durchführung der o.g. Untersuchungen an Institutionen der Charité – Universitätsmedizin Berlin wurde ich eingehend informiert. Mir wurde ein Exemplar des Informationsblattes überreicht, welches bei der Krankenakte verbleibt. Ich hatte ausreichend Möglichkeit, Rückfragen zu stellen.

Ich willige in die Teilnahme an dieser Untersuchung ein und erkläre mich bereit, das bei mir entnommene Bandscheibenmaterial, welches sonst verworfen wird, für weitere Untersuchungen zur Verfügung zu stellen.

Mir ist bekannt, dass die Teilnahme freiwillig ist und ich jederzeit ohne die Angabe von Gründen meine Einwilligung widerrufen kann.

Ich bin mit der Erfassung meiner Daten und Speicherung per EDV zur wissenschaftlichen Auswertung dieser Untersuchung einverstanden. Gegen eine Weitergabe der Daten an studienbeteiligte Personen und gegen eine Veröffentlichung der aus den Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse in pseudonymisierter Form habe ich keine Einwände.

Berlin, den

Unterschrift Patient

Berlin, den

Unterschrift des aufklärenden Arztes