Aus der Klinik und Poliklinik
für Orthopädie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Direktor: Professor Dr. med. W. Rüther

Proteinbiochemische Mechanismen der algogenen Bandscheibendegeneration: Bedeutung von TNF-α, IL-1α, IL-6, MMP-3, TGF-β1,2,3 und Substanz P

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Barbara Dorothea Friedrichs
aus
Esslingen a. N.

Hamburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereiches
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in:

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AF	Anulus fibrosus
APP	Akute Phase Protein
BMI	Body mass index
BS	Bandscheibe
BSA	Bovines Serum Album
BSF-2	B-cell-stimulatory-factor-2
CGRP	Calcitonin gene-related Peptide
Con-A	Concanavalin-A
CRP	C-reaktives Protein
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
G-CSF	Granulozyte-colony-stimulating-factor
GIT	Gastrointestinal Trakt
HSF	Hepatocyte-stimulating-factor
IFN-γ	Interferon-γ
IL-1α	Interleukin-1α
IL-6	Interleukin-6
K	Kontrollbandscheibe
kDa	Kilodalton
kp	Kilopond
LWS	Lendenwirbelsäule
MMP-3	Matrixmetalloproteinase-3
mRNA	messenger Ribonucleic acid
MRT	Magnet Resonanz Tomographie
NKA	Neurokinin A
NKB	Neurokinin B
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NO	Stickoxid
NP	Nucleus pulposus
PG	Proteoglykan
PGE2	Prostaglandin E2
PK	Positivkontrolle
PNS	Peripheres Nervensystem
PPT-A	Preprotachykinin-A

proMMP	Vorform von MMP
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Seq	Sequester
SP	Substanz P
SP7-11	Substanz P Spaltprodukt
TBST	Tris-gepufferte Salz-Tween-Lösung (Tris-buffered-saline-tween)
TGF-β	Transforming growth factor-β
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
VAS	Visual analog scale
ZNS	Zentrales Nervensystem

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

1.1. Hintergrund 3

1.2. Anatomie des Bewegungssegmentes 4

1.3. Die Bandscheibe

1.3.1. Histologie und Biochemie 5

1.3.2. Nutrition 7

1.3.3. Funktion 7

1.3.4. Biomechanik 8

1.4. Degenerative Veränderungen der Bandscheibe 9

1.5. Klinische Symptome bandscheibenbedingter Erkrankungen

1.5.1. Lokales Lumbalsyndrom, Lumbago 11

1.5.2. Pseudoradikuläres Lumbalsyndrom, Facettensyndrom 12

1.5.3. Radikuläres Lumbal- und Wurzelsyndrom, Ischialgie 13

1.5.4. Postnukleotomiesyndrom 14

1.6. Pathogenese vertebragener Schmerzen 14

1.7. An der Bandscheibendegeneration beteiligte proteinbiochemische Mechanismen

1.7.1. Substanz P 17

1.7.2. Proinflammatorische Zytokine: TNF-α, IL-1α und IL-6 19

1.7.3. Bedeutung von TGF-β und MMP-3 21

1.8. Fragestellung 23

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Auswahl des Patientenkollektivs 24

2.1.2. Reaktionssysteme (Antikörper, Positivkontrollen, ELISA) 25

2.1.3. Verwendete Substanzen, Hilfsmittel, Geräte 25

2.1.4. Zusammensetzung der verwendeten Gele und Lösungen 27

2.2. Methoden

2.2.1. Aufbereitung der Proben 28

2.2.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 29

2.2.3. Enzymimmonoassay 30

2.2.4. Auswertung und EDV 31

3. ERGEBNISSE

3.1. Schmerzanamnese und Blutbild der Patienten 33

3.2. Substanz P (SP, PPT-A) 34

3.3. Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) 34

3.4. Interleukin-1α (IL-1α) 35

3.5. Interleukin-6 (IL-6) 35

3.6. Matrixmetalloproteinase-3 (MMP-3) 36

3.7. Transforming Growth Factor-β 1,2,3 (TGF-β 1,2,3) 36

3.8. Bildanhang - Ergebnisse

3.8.1.1. SP – ELISA 37

3.8.1.2. PPT-A (SP-Vorform) – Westernblot 38

3.8.2.1. TNF-α – ELISA 39

3.8.2.2. TNF-α – Westernblot 40

3.8.3.1. IL-1α – ELISA 41

3.8.3.2. IL-1α – Westernblot 42

3.8.4.1. IL-6 – ELISA 43

3.8.4.2. IL-6 – Westernblot 44

3.8.5. MMP-3 – Westernblot 45

3.8.6. TGF-β – Westernblot 46

4. DISKUSSION

4.1. Substanz P 47

4.2. TNF-α, IL-1α, IL-6 48

4.3. MMP-3, TGF-β 49

4.4. Bedeutung hinsichtlich therapeutischer Maßnahmen 50

5. ZUSAMMENFASSUNG 54

6. LITERATURVERZEICHNIS 56

7. DANKSAGUNG 60

8. LEBENSLAUF 61

9. ERKLÄRUNG 62

EINLEITUNG

1.1. Hintergrund

Degenerative Erkrankungen der Wirbelsäule sind eine Volkskrankheit und gehören neben den Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems zu den wichtigsten und häufigsten Krankheiten weltweit.
In entsprechenden Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass jeder 10. Patient in einer Allgemeinarztpraxis den Arzt aufgrund bandscheibenbedingter Erkrankungen aufsucht. In einer orthopädischen Poliklinik ist dies jeder 3. und beim niedergelassenen Orthopäden jeder 2. Patient [1]. Bei isolierter Betrachtung der behandlungsbedürftigen Lumbalsyndrome zeigt sich, dass dieses Krankheitsbild bei jedem 3. Patienten der Grund für das Aufsuchen einer orthopädischen Facharztpraxis ist. Insgesamt verursachen bandscheibenbedingte Erkrankungen 37,8 % der ambulant behandelten orthopädischen Leiden. In 92.7 % der Wirbelsäulenerkrankungen finden sich degenerative Bandscheibenschäden als Ursache. Zwei Drittel aller bandscheibenbedingten Erkrankungen treten an der Lendenwirbelsäule (LWS) auf [2]. Aufgrund bandscheibenbedingter Erkrankungen erfolgen in Deutschland 20 % der Krankschreibungen und 50 % der vorzeitig gestellten Rentenanträge [2]. Durch die hieraus resultierenden hohen Gesundheitskosten hat das Krankheitsbild auch eine immense volkswirtschaftliche Bedeutung, und das Interesse an der Erforschung der Ursachen und Verbesserung der therapeutischen Maßnahmen ist besonders hoch.

Die ursprüngliche Annahme, die schmerzhafte Symptomatik des Bandscheibenleidens entstünde allein durch eine Nervenkompression ist längst überholt. Heutzutage ist bekannt, dass es sich um einen viel komplexeren Vorgang handelt [3] [4]. Zum einen scheint eine Vielzahl von Organen und Strukturen wie zum Beispiel die Wirbelsäule, die angrenzende Muskulatur, die Haut, das Becken und die unteren Extremitäten beteiligt zu sein [5]. Zum anderen scheinen komplexe biochemische und pathophysiologische Mechanismen involviert zu sein. So scheint die Substanz P, ein Neurotransmitter und Tachykinin, eine besondere Rolle bei der Chronifizierung von Schmerzen zu spielen. Des weitern ist Substanz P wohl auch für morphologische Veränderungen im Rahmen degenerativer Prozesse bedeutsam. Auch proinflammatorische Zytokine, wie zum Beispiel der Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) und Interleukine (z. B. IL-1α und IL-6) scheinen im Rahmen eines Entzündungsprozesses sowohl an der Schmerzentstehung als auch an der Degeneration beteiligt zu sein [6] [3] [4]. Am Umbau der Gewebematrix sind wahrscheinlich unter anderem die Matrixmetalloproteinase-3 (MMP-3) und der Wachstumsfaktor TGF-β (Transforming growth factor) involviert.

1.2. Anatomie des Bewegungssegmentes

Die Wirbelsäule des Menschen ist aus 24 beweglichen Wirbeln, den zum Os sacrum und Os coccygis verwachsenen Wirbeln und den dazwischenliegenden 23 Bandscheiben aufgebaut.
Die Wirbelsäule weist in der Sagittalebene eine nach ventral konvexe Lordose der Hals- und Lendenwirbelsäule und eine nach dorsal konvexe Kyphose der Brustwirbelsäule und des Kreuzbeins als physiologische Krümmung auf. Die Wirbelsäule als Achsenorgan hat eine statische und eine kinematische Funktion. Sie bildet damit die Grundlage für die Beweglichkeit des Stammes. Hierbei dient sie vor allem der Aufnahme und Weiterleitung von Stößen, die sowohl bei der aktiven als auch bei der passiven Bewegung einwirken. Darüber hinaus ist die Wirbelsäule eine wirksame Schutzhülle für das Rückenmark und die von ihm ausgehenden Nerven [7].
Die Funktionen der Wirbelsäule können nur im gemeinsamen Zusammenspiel all ihrer Anteile ablaufen. Junghans [8] prägte den Begriff des Bewegungssegmentes, das die kleinste Bau- und Funktionseinheit der Wirbelsäule beschreibt. Zu dem Bewegungssegment werden jeweils zwei benachbarte Wirbelhälften, die sie verbindende Bandscheibe, das vordere und hintere Längsband, das Ligamentum flavum, die Wirbelgelenke sowie alle Weichteile, die sich in gleicher Höhe im Wirbelkanal, im Foramen intervertebrale und zwischen den Dorn- und Querfortsätzen befinden, gezählt.

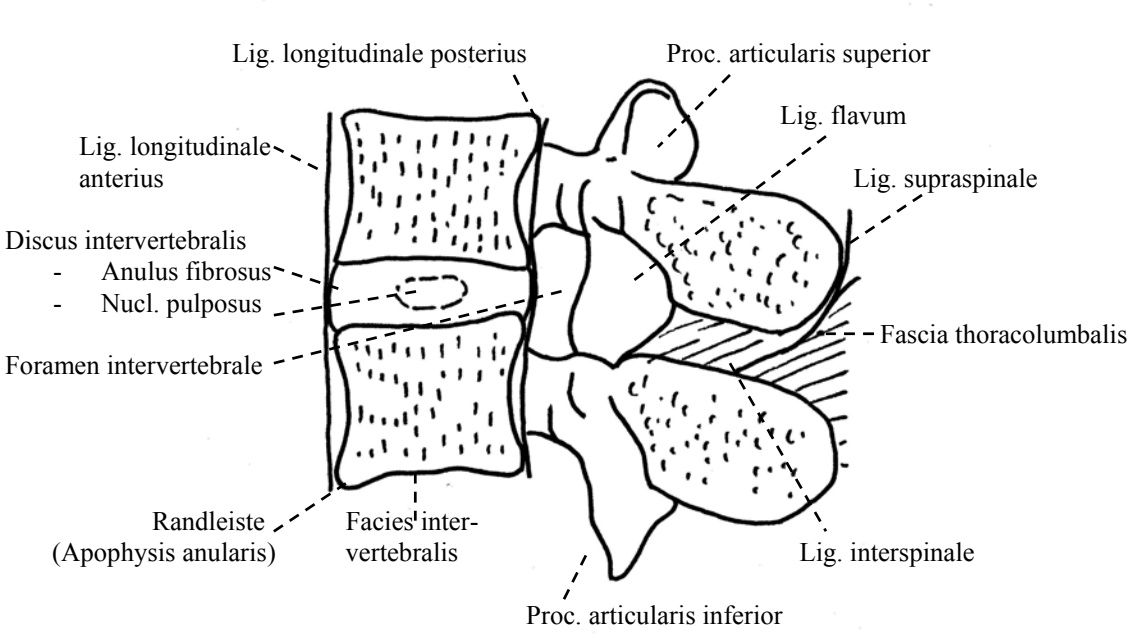


Abb. 1: Darstellung der Anatomie des Bewegungssegmentes der Wirbelsäule, bestehend aus zwei benachbarten Wirbelhälften, die sie verbindende Bandscheibe, das vordere und hintere Längsband, das Ligamentum flavum, die Wirbelgelenke sowie beteiligte Weichteile.

1.3. Die Bandscheibe

1.3.1. Histologie und Biochemie

Die Bandscheiben (Discus intervertebralis) bestehen aus einem äußeren Faserring, dem Anulus fibrosus, und einem inneren Gallertkern, dem Nucleus pulposus. Zwischen den Wirbelkörpern und den Bandscheiben befindet sich sowohl kranial als auch kaudal eine hyaline Knorpelplatte, die sogenannte Endplatte. Histologisch und biochemisch gesehen setzen sich die Hauptelemente des Zwischenwirbelabschnitts aus grundverschiedenen Geweben zusammen. Die Knorpelplatten bestehen aus hyalinem Knorpel, der Bandscheibenring hingegen vorwiegend aus Fasern und der Gallertkern aus Grundsubstanz [9] [10] [11].

Die Bandscheiben sind in allen Bereichen der präsakralen Wirbelsäule gleich aufgebaut. Sie nehmen von kranial nach kaudal an Höhe und Umfang zu und tragen durch ihre schwach keilförmige Form zur normalen Krümmung der Wirbelsäule bei. Jede Zwischenwirbelscheibe besteht aus einem zentral gelegenen, wasserreichen Gallertkern, dem Nucleus pulposus, der von einem konzentrisch angeordneten kollagenhaltigen Faserring, dem Anulus fibrosus, umschlossen ist. Den Übergang zu den porenhaltigen Grund- und Deckplatten der Wirbelkörper bilden die 0,1 – 0,6 mm dünnen Hyalinknorpelplatten, welche ebenfalls Unterbrechungen aufweisen [12]. Diese Knorpelplatten liegen den Wirbelkörperabschlussplatten direkt auf. Ihr Aufbau wird durch die einwirkenden Kräfte geprägt. Unterhalb des Nucleus pulposus ist der Druck am höchsten und die Knorpelplatte daher am dünnsten [13].

Der Nucleus pulposus ist ein Netzwerk aus Kollagenfasern, die von einem Gel umgeben sind. Verantwortlich für den hohen Wassergehalt dieses Gels sind die Proteoglykane. Der Gallertkern nimmt ca. 50 % der Querschnittsfläche der Bandscheibe eines Erwachsenen ein und liegt leicht dorsal exzentrisch. An das Gewebe des Nucleus pulposus grenzen die Fasern des Anulus fibrosus, einem Netzwerk stabiler Kollagenfasern, die eine Ausdehnung des Nucleus pulposus verhindern. Die Fasern des Anulus fibrosus verlaufen in schräger Richtung schraubig zur Längsachse der Wirbelsäule und kreuzen sich in 10 bis 15 aufeinanderfolgenden Schichten (Lamellen). Während die inneren Faserlamellen kontinuierlich in den hyalinen Knorpelbelag der Wirbeldeckplatten übergehen und dort fest in der Interzellularsubstanz verankert sind, sind die äußeren, zugkräftigeren Faserlamellen fest an der knöchernen Randleiste des Wirbelkörpers befestigt (Sharpey-Fasern) [7]. Der Anulus fibrosus ist ventral und lateral kräftiger als dorsal, wo er nur wenige und zudem relativ dünne Lamellen aufweist. Im Innern ist der Faserring zunächst deutlich vom Nucleus zu unterscheiden, mit zunehmendem Alter wird der Übergang allerdings immer undeutlicher.

Negativ geladene Proteoglykane bilden den Hauptbestandteil der gelartigen Grundsubstanz. Es handelt sich hierbei vorwiegend um hochmolekulare Glycosaminoglycane (Mucopolysaccharide), die mit Ausnahme der Hyaluronsäure an Protein gebunden sind. Die beiden am häufigsten in der Bandscheibe

vorhandenen Proteoglykane sind Chondroitinsulfat und Keratansulfat [14]. Ihre Konzentration ist mit etwa 50 % des Trockengewichts im Nucleus am größten. Zum äußeren Anulus hin nimmt der Gehalt stetig ab und beträgt dort nur noch 10 % des Trockengewichtes [15]. Aufgrund der Fähigkeit, an freien negativen Ladungen reichlich Wasser zu binden, bestimmen die Proteoglykane die Quellbarkeit, Elastizität und Viskosität der Bandscheibe. Bei der Geburt ist der Wassergehalt des Nucleus mit ca. 90 % am größten und sinkt im Laufe des Lebens bis auf 70 % ab [15]. Die Ursache liegt hierbei in einer Strukturänderung der Proteoglykane, die daraufhin nicht mehr so viel Wasser binden können. Der Wasseranteil im Anulus fibrosus ist mit nur 60 – 70 % geringer als im Nucleus pulposus.

Im Bereich der Bandscheibe findet man im äußeren Anulus mit ca. 70 – 80 % des Trockengewichtes die höchste Kollagenkonzentration. Zum Nucleus hin sinkt die Konzentration stetig und beträgt innerhalb des Gallertkerns nur ca. 20 – 30 % [14].

In der Bandscheibe vorkommende Kollagene sind hauptsächlich die Typen I und II, wobei das in Haut, Sehnen und Ligamenten nachweisbare Typ I Kollagen vor allem im Anulus fibrosus und das knorpelspezifische Typ II Kollagen im Nucleus pulposus vorhanden ist [16]. Weitere vorkommende Kollagene sind Typ III, V, VI, IX, X und XI.

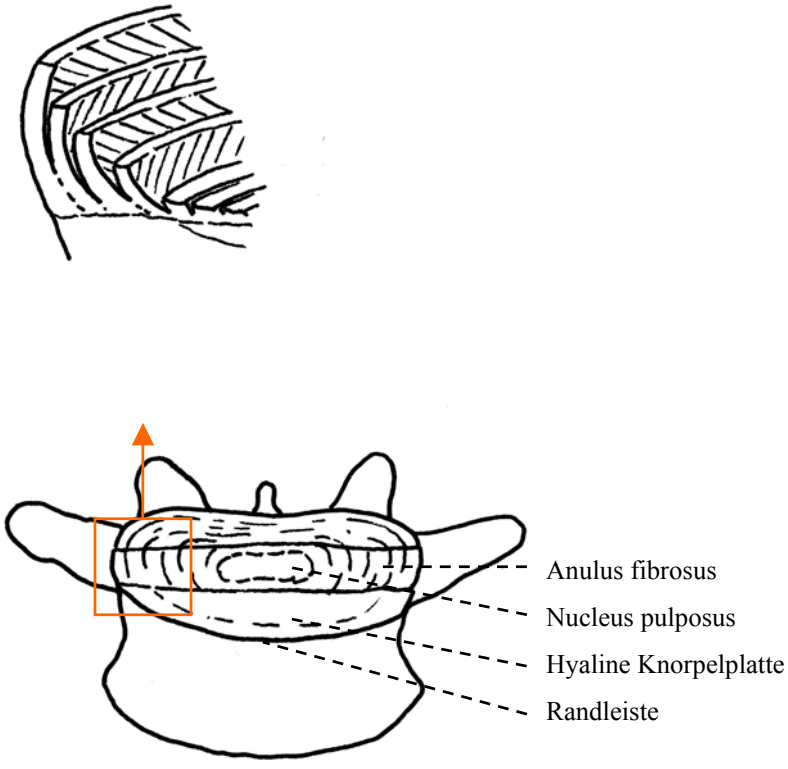


Abb. 2: Darstellung der Bandscheibe. Deutlich zu sehen sind die gegenläufig angeordneten Lamellen des Anulus fibrosus.

1.3.2. Nutrition

Die Zwischenwirbelscheibe des Säuglings weist bis in die tiefen Schichten des Faserringes, allerdings niemals bis in den Gallertkern reichende Blutgefäße auf [17]. Diese Gefäße bilden sich ab dem 2. Lebensjahr wieder zurück, so dass die Bandscheibe zur größten gefäßlosen Struktur des menschlichen Körpers wird [18] [19]. Ursächlich für die Rückbildung der Gefäße wird unter anderem die Druckatrophie beim Übergang zum aufrechten Gang gemacht [2].
Der Nährstoffaustausch der Bandscheibe des Erwachsenen erfolgt hauptsächlich auf zwei Diffusionswegen. Zum einen von in der Peripherie des Anulus liegenden Gefäßen aus, zum anderen von Kapillaren aus, die sich im Wirbelkörpermark befinden. Die mit Poren durchsetzte angrenzende Knorpelplatte stellt dabei gewissermaßen eine semipermeable Grenzschicht dar [20] [21]. Dieser letztgenannte Weg scheint hierbei die entscheidende Rolle zu spielen und ist somit für den Hauptteil des Stoffwechselaustausches verantwortlich.

1.3.3. Funktion

Die Hauptaufgabe der Bandscheibe ist es, einen deformierbaren Raum zwischen den Wirbelkörpern zu bilden und somit als gelenkähnliche Struktur die Beweglichkeit der Wirbelsäule zu ermöglichen. Als Drehpunkt im Bewegungssegment dient dabei der Nucleus pulposus, wobei das Bewegungsausmaß durch Knochen- und Bandstrukturen limitiert wird [7]. Als Hauptbewegungsrichtungen gelten die Ventralflexion und Dorsalextension, wobei die nur minimale Rotation von etwa 5 ° nur durch die Restelastizität der gelenkigen und ligamentären Strukturen bedingt ist [22]. Bei der Flexion ist die Bewegung durch die Wirbelvorderkanten und Bandstrukturen dorsal des Nucleus pulposus begrenzt, wohingegen die ventralen Bandanteile, Wirbelbögen und Dornfortsätze die Extension einschränken.
Gleichzeitig dient die Bandscheibe der Absorption und gleichmäßigen Verteilung der bei Bewegung auftretenden Kompressions- und Biegungsdrücke. Der Nucleus pulposus überträgt hierbei vertikale Kräfte auf die knorpelige Endplatte und den Anulus fibrosus. Dieser kann aufgrund seiner komplexen Kollagenfaseranordnung sehr hohe Drücke aufnehmen und gleichzeitig komprimiert gedreht oder gebogen werden. Hierbei unterliegt er jedoch einer hohen Zugbeanspruchung [11] [23]. Bei symmetrischer axialer Druckbelastung wird der Nucleus pulposus allseits gegen den elastischen Anulus fibrosus gepresst und kehrt anschließend wieder ins Zentrum zurück. Bei asymmetrischer Belastung hingegen weicht dieses mobile zentrale Bandscheibengewebe zum weniger belasteten Bandscheibenabschnitt aus [24] [25]. Die Rückverlagerungszeit kann durch symmetrische Kompression oder Extension beschleunigt werden. Diese Verlagerungsfähigkeit lässt mit zunehmendem Alter nach, so dass bei anhaltender, starker asymmetrischer Kompression der Gallertkern in seiner dezentralen Position verbleiben kann [2].

Die Beanspruchbarkeit und Widerstandskraft der intakten Bandscheibe gegenüber traumatischen Einwirkungen ist höher als diejenige des Wirbelkörpers. Ist der Anulus fibrosus jedoch degenerativ verändert und weist Risse auf, und ist der Nucleus pulposus über die physiologischen Grenzen hinaus verlagerbar, so wird die Bandscheibe anfälliger gegenüber traumatischen Einwirkungen und Belastungen [2].

1.3.4. Biomechanik

Osmotische Kräfte erlauben es der Bandscheibe, ihren Wassergehalt auch bei hoher Druckbelastung aufrechtzuerhalten. Kolloidosmotischer Druck und Quelldruck des Bandscheibengewebes ergeben zusammen den onkotischen Druck. Im Gegensatz zur Umgebung des Zwischenwirbelabschnitts zeichnet sich die Bandscheibe durch einen hohen hydrostatischen und onkotischen Druck aus. Es ergibt sich dadurch eine Wechselbeziehung zwischen extradiskalem hydrostatischen und intradiskalem onkotischen Druck einerseits und intradiskalem hydrostatischen und extradiskalem onkotischen Druck andererseits. Gleichgewichtsverschiebungen resultieren in Flüssigkeits- und Substanzverschiebungen, die sowohl für die Ernährung des Bandscheibengewebes als auch für die Funktion des Bewegungssegments ausschlaggebend sind [2].
Das osmotische System ist von der mechanischen wie auch von der biochemischen Seite her zu beeinflussen. Durch den Wechsel der Körperposition unterliegt der intradiskale hydrostatische Druck starken Schwankungen. Unter Wasserverlust erhöht sich der relative Elektrolytgehalt und baut einen osmotischen Druckgradienten auf, der einem weiteren Wasserverlust entgegenwirkt [26]. Dieser druckabhängige Flüssigkeitsaustausch im Zwischenwirbelabschnitt bewirkt eine Hin- und Herbewegung von Wasser und niedermolekularen Stoffwechselsubstanzen an den Bandscheibengrenzen und somit die Versorgung der Bandscheibenzellen mit Nährstoffen und auch den Abtransport von Stoffwechselendprodukten. Haltungskonstanz, vor allem in Positionen mit hohem intradiskalen Druck, bedeutet somit eine Beeinträchtigung dieses Stoffaustausches.
Auch Schwingungen im Resonanzbereich von 3,5 - 8 Hz wirken sich negativ auf die druckabhängigen Flüssigkeitsverschiebungen aus [27] [2]. Insbesondere bei Berufsgruppen, die ihre Tätigkeit in sitzender Position in ungefederten Fahrzeugen ausüben (zum Beispiel Piloten, Fahrzeug- und Maschinenführer), wurde ein gehäuftes Auftreten von orthopädischen Beschwerden im Rückenbereich beschrieben [28] [29] [30].
Aufgrund der aufrechten Haltung des Menschen unterliegen insbesondere die unteren Abschnitte der Wirbelsäule starken Belastungen. Nachemson [31] zeigte anhand von in-vivo-Messungen, dass der intradiskale Druck im Liegen zwischen 15 und 25 kp, im Stehen 100 kp und in unangelehnter sitzender Stellung bis zu 150 kp beträgt. Er erhöht sich beim Bücken, Heben und Tragen auf mehrere Hundert Kilopond (kp) [32]. Husten, Pressen und Lachen bewirkt eine Druckerhöhung in den

lumbalen Bandscheiben um 50 kp; beim Sitzen reduziert sich dieser Belastungsdruck mit zunehmender Schrägstellung der Rückenlehne auf zum Teil unter 80 kp [31]. Beim Heben und Tragen wird die Bandscheibenbelastung um so größer, je weiter der Gegenstand von der Rumpfachse entfernt gehalten wird [33]. Die größten Hauptspannungsdifferenzen und somit Schubspannungen treten im Bandscheibenzentrum auf. Hierbei wird vor allem das lumbosakrale Bewegungssegment stark beansprucht. Insgesamt führen diese extremen Druckbelastungen zu starken Degenerationserscheinungen des bradytrophen Bandscheibengewebes. Durch Betätigung der Bauchpresse oder auch durch das Tragen einer Bauchpelotte in einer Orthese kann die Belastung der lumbalen Bandscheiben um bis zu 30 % reduziert werden [34].

1.4. Degenerative Veränderungen der Bandscheibe

Über das Degenerationsverhalten der Bandscheiben bestehen deskriptive Erkenntnisse. Der physiologische Alterungsprozess der Bandscheibe beginnt schon mit dem 10. Lebensjahr infolge von Druckatrophie der Blutgefäße im Zwischenwirbelraum und Umstellung der Versorgung der Bandscheibe mit Stoffwechselprodukten durch Diffusion. Konstitutionelle Faktoren und eine erbliche Belastung können an der Degeneration mitbeteiligt sein [35]. Die degenerativen Erscheinungen beginnen zum Teil mit Rissen und Spaltbildungen im Anulus fibrosus, in die der Nucleus pulposus zum Teil eindringt. Diese Veränderungen sind radiologisch nicht nachweisbar. Erst im weiteren Verlauf, bedingt durch den Elastizitätsverlust der Bandscheibe, der zu einer Lockerung im Bewegungssegment mit sekundären Veränderungen führt, werden röntgenologische Zeichen nachweisbar. Hierzu zählen Wirbelverschiebung in Funktionsaufnahmen, Spondylophyten an den Ansatzstellen des vorderen Längsbandes (Spondylosis deformans), Arthrosis deformans und Subluxation an den Wirbelgelenken und Einbruch von Bandscheibengewebe in die Wirbelkörper (sogenannte Schmorlsche Knötchen) [36].

Die zunehmende Degeneration der Bandscheiben kann zu verschiedenartigen Formen von Läsionen führen [36]. Die mildeste Form ist die ballonierte Bandscheibe. Der intraspongiöse Diskusprolaps ist das Schmorlsche Knorpelknötchen. Voraussetzung für die Entstehung sind ein erhaltener Turgor des Nucleus pulposus und eine verminderte Widerstandskraft der knorpeligen Abschlussplatte (z.B. durch Gefäßdurchtrittsnarben, frühere Durchtrittsstelle der Chorda dorsalis, nekrotische Zerfallsherde, entwicklungsbedingte Unterbrechung der Faserlamellen in den Abschlussplatten). Eine weitere Form ist die Bandscheibenverschmälerung durch Resorption der Bandscheibe in die subchondralen Gefäßkanäle und Zurückbleiben von Gas im Intervertebralraum (Vakuum-Phänomen). Bei fortgeschrittener Degeneration des Anulus fibrosus und noch intakten äußeren Anteilen des Anulus wölbt sich die Bandscheibe unter axialer Druckbelastung in den Wirbelkanal vor, es entsteht eine Bandscheibenprotusion. Bei zerrissenem Faserring und Längsband kann Bandscheibengewebe durch die

entstandene Öffnung in den Wirbelkanal vordringen. In diesem Fall spricht man von einem Bandscheibenprolaps. Die Prolabierungen treten vor allem in medialer und medio-lateraler Richtung auf. Nur in 2 - 12 % der Fälle kommt es zu einem lateralen Bandscheibenvorfall. In den häufigsten Fällen hat das vorgefallene Material noch festen Kontakt mit dem übrigen Bandscheibengewebe. Gelangen jedoch freie Bandscheibenfragmente (Sequester) in das Lumen des Wirbelkanals, spricht man von einem frei sequestrierten Bandscheibenprolaps [36].

Einteilung der Altersveränderungen der Bandscheibe nach KRÄMER [2]:

Stadium I (bis 12. Lebensjahr)
- Symptomloses Zurückbilden der Blutgefäße (2. – 4. Lebensjahr)

Stadium II (12. - 20. Lebensjahr)
- Vorwölbung des hinteren Längsbandes durch intradiskale Massenverschiebung
- Lendenstrecksteife

Stadium III (20. - 35. Lebensjahr)
- Kleine Einrisse der zentralen Anteile des Anulus fibrosus, in die Gallertkernanteile eindringen
- Durch Zurückverlagerung des Gallertkerns rückläufiges Krankheitsbild
- Akute Lumbago

Stadium IV (Mittleres Lebensalter)
- Deutliche Einrisse und Verlegung des Gallertkerns in die Außenzonen
- Elastizitätsverlust des Faserringes
- Prolaps und Sequestrierung möglich

Stadium V (Fortgeschrittenes Alter)
- Lockere Bandscheibenkonsistenz mit knöcherner Einengung und Instabilität
- Vermehrte Belastung der Wirbelgelenke mit muskulärer Verspannung

Stadium VI (Höheres Alter)
- Endstadium der Bandscheibendegeneration
- Völlige Austrocknung der Bandscheibe
- Teilversteifung der LWS mit relativer Beschwerdefreiheit

Bandscheibenbedingte Erkrankungen der Lendenwirbelsäule (LWS) haben eine multifaktorielle Ätiologie. Endogene Faktoren, die eine frühzeitige Alterung der Bandscheibe verursachen, werden als diskogene Risikofaktoren bezeichnet. Juvenile Aufbaustörungen (Morbus Scheuermann) oder Übergangsstörungen (numerische Variationen, Übergangswirbel) der Wirbelsäule, Blockbildungen zwischen Wirbelkörpern, Achsenabweichungen (z.B. Skoliose) und interartikuläre Lockerungen (z.B. Spondylolyse und Spondylolisthesis) werden hierunter subsummiert. Stoffwechsel- und rheumatische Erkrankungen sowie Tumoren und Entzündungen sind insgesamt selten. Exogen können Beinlängendifferenzen von mehreren Zentimetern, Oberschenkelamputationen, deutliches Übergewicht, Veränderungen des Gangbildes (z.B. Versteifungen von Hüft- oder Kniegelenken), Paresen der unteren Gliedmaßen (z.B. nach Polio) und auch eine muskelschlaffe Körperhaltung (z.B. „Hängebauch“, vermehrte Beckenkippung, Hyperlordose) die üblichen Diskusveränderungen deutlich beschleunigen. Ungünstig auf den Verlauf von Bandscheibenerkrankungen wirken sich äußere Umstände und Tätigkeiten mit wiederkehrender Zwangshaltung und mangelhafter Bewegung aus, die zu vermehrtem Druck, Knickung, Scherung und Torsion im Bandscheibenbereich führen [2].

1.5. Klinische Symptome bandscheibenbedingter Erkrankungen

Kommt es durch degenerative Veränderungen zu Beschwerden, so werden diese unter dem Begriff Lumbalsyndrom zusammengefasst. Das Lumbalsyndrom wiederum lässt sich folgendermaßen einteilen:

1.5.1. Lokales Lumbalsyndrom, Lumbago

Am häufigsten tritt der lumbale Bandscheibenschaden als lokales Lumbalsyndrom auf. Unter einem lokalen Lumbalsyndrom versteht man alle klinischen Erscheinungen, welche direkt oder indirekt von degenerativen und funktionellen Störungen lumbaler Bewegungssegmente ausgehen und deren Symptomatik auf die Lumbalregion beschränkt bleibt. Das lokale Lumbalsyndrom umfasst zahlreiche Krankheitsbilder, beginnend mit der akuten Form (Lumbago), bis hin zum chronisch rezidivierenden Kreuzschmerz. Für die Lumbago ist ein akut einsetzender Kreuzschmerz kennzeichnend. Alle Leitsymptome des lokalen Lumbalsyndroms sind akzentuiert und setzen plötzlich ein. Auslösend ist häufig eine extreme Hyperflexion der Wirbelsäule mit Vorwölbung des Bandscheibengewebes nach dorsal [2]. Hiervon sind vor allem degenerativ vorgeschädigte Disci betroffen. Die intradiskale Massenverschiebung führt häufig primär zu einer Irritation des N. sinuvertebralis, reproduzierbar durch intraoperativ ausgeübten instrumentellen Druck [7]. Die Hauptschmerzzone findet sich in der unteren Lumbalregion und über dem Kreuzbein. Auch eine diffuse oder pseudoradikuläre

Schmerzausstrahlung ist möglich [2]. Vermittelt durch die lateralen Äste der Rr. dorsales der Spinalnerven fällt klinisch ein Hartspann der paravertebralen Muskulatur mit Schonhaltung der Wirbelsäule auf, was in eine sogenannte Bewegungssperre mündet. Elektromyographisch lässt sich eine Daueraktivität einzelner tonisch entladender motorischer Einheiten nachweisen. Außerdem kommt es zur Aufhebung der physiologischen Lendenlordose mit Vorneigung des Oberkörpers. Die weitere Vorneigung ist jedoch stark erschwert, dokumentierbar durch Erhebung des Finger-Fußbodenabstandes und des Zeichens nach SCHOBER. Typisch ist weiterhin eine stark gesteigerte Druck- und Klopfempfindlichkeit mit leicht auslösbarem Stauchungsschmerz. Eine durch Husten, Pressen und Niesen verursachte Druckerhöhung der intraabdominalen Gefäße mit Erhöhung des Blutvolumens der Wirbelvenengeflechte führt zur Irritation der vom N. sinuvertebralis sensibel versorgten Dura mater. Eine Rückbildung der obengenannten Symptome erfolgt innerhalb von Stunden oder Tagen bei Rückverlagerung des prolabierten Anteils oder osmotisch bedingter Schrumpfung des nach dorsal verlagerten Bandscheibengewebes. Von einer Lumbago sind in der Regel jüngere Patienten betroffen, da bei ihnen am ehesten die Voraussetzungen für ein intradiskales Derangement gegeben sind [2].

1.5.2. Pseudoradikuläres Lumbalsyndrom, Facettensyndrom

Beim nichtradikulären Beinschmerz, dem Facettensyndrom, wird das Dermatom in seiner Schmerzausbreitung im Gegensatz zum radikulären Lumbalsyndrom nicht betroffen. Die Schmerzen nach distal reichen höchstens bis zur Ferse und dorsalem Fußrücken bei deutlicher Belastungsabhängigkeit. Nach BRÜGGER [37] ziehen die Schmerzen in der Regel nicht über das Kniegelenk hinaus. Die meisten Facettensyndrome sind belastungsabhängig und treten gewöhnlich im Laufe des Tages auf. Bei Horizontallagerung mit leicht angewinkelten Hüft- und Kniegelenken verschwinden diese wieder. Der Schmerzcharakter wird als stechend bei Bewegung beschrieben. Daneben kommt es zu einer schmerzhaften reflektorischen Muskelverspannung. Die Beweglichkeit der Lendenwirbelsäule ist hingegen nur geringgradig eingeschränkt. Muskuläre Ausfälle oder Reflexstörungen sowie Wurzeldehnungszeichen (LASEGUE, BRAGARD) sind in der Regel nicht nachweisbar. Charakteristisch ist das positive Viererzeichen: Das Auflegen der Ferse des erkrankten Beines auf das gestreckte, gesunde Knie löst durch die Torquierung der Lendenwirbelsäule Schmerz aus [38]. Dieser entsteht ohne Bedrängung der Nervenwurzel durch Irritation der Wirbelgelenkkapsel, die durch den medialen Ast des R. dorsalis versorgt wird. Auch Kreuzbein- und Kreuz-Darmbein-Fugen können druckempfindlich sein, da die Kreuzbein-Darmbein-Gelenke funktionell und neuroanatomisch als unterste Facetten anzusehen sind. Beweisend für ein Facettensyndrom sind Schmerzauslöschung oder Schmerzreduzierung durch Injektion eines Lokalanästhetikums in die betroffene Wirbelgelenkkapsel [2].

1.5.3. Radikuläres Lumbal- und Wurzelsyndrom, Ischialgie

Eine dermatomgebundene Schmerzausstrahlung durch diskogene Nervenwurzelbedrängung mit Reizung des R. ventralis des Spinalnervs, verursacht durch Bandscheibenprotrusion, Prolaps oder ossär bedingte Nervenwurzelreizung kennzeichnet das radikuläre Lumbalsyndrom. Das Dermatom ist dabei nicht immer vollständig betroffen. Auch der Rückenschmerz kann nur geringgradig ausgeprägt sein oder fehlen. Typisch sind multiple Remissionen und Exazerbationen der Schmerzsymptomatik [38]. Es finden sich dabei eine Vielzahl von Symptomen, die Hinweise auf die Höhenlokalisation, die Körperhälfte und die Richtung der Verlagerung des Bandscheibengewebes geben. Es treten Schmerzen, Sensibilitätsstörungen, motorische Ausfälle und Reflexstörungen auf. Klinisch fällt zudem eine skoliotische Fehlhaltung mit Überhang des Rumpfes zur betroffenen oder zur gegenüberliegenden Seite auf, da der Patient unwillkürlich die Rumpfhaltung einnimmt, bei der die Kompression der Nervenwurzel am geringsten ist [2]. Das Zeichen nach LASEGUE ist häufig positiv, d.h. beim liegenden Patienten treten bei Anhebung des passiv gestreckten Beines Schmerzen im Bein bei einer Hüftbeugung unter 60° auf. Jüngere Ischiaspatienten weisen eine starke Fehlhaltung, einen früh positiven LASEGUE und ein proximales Schmerzband auf. Bei älteren Patienten überwiegt der periphere Schmerz bei nur mäßiger Fehlhaltung und endgradigem LASEGUE. Die Symptome lassen darauf schließen, dass bei jüngeren Menschen eher eine Protrusions- und bei älteren Patienten eine Prolapsischialgie vorliegt, wobei die Heilungsaussichten bei einer Protrusion wesentlich günstiger sind als bei einem Prolaps. Dies begründet sich in der Tatsache, dass das verlagerte Bandscheibengewebe bei einer Protrusion, als Teil des osmotischen Systems der Bandscheibe, an allen physiologischen Volumen- und Konsistenzänderungen teilnimmt [39]. Durch Dorsalextension des Fußes wird der Schmerz intensiviert. Dies entspricht einem positiven Zeichen nach BRAGARD. Beim medialen Prolaps findet sich häufig ein gekreuztes Zeichen nach LASEGUE. Der Ischiadikusverlauf ist zudem druckempfindlich (VALLEIX-Druckpunkte). Findet sich bei der klinischen Untersuchung ein Kontrollverlust von Miktion und Defäkation sowie eine Reithosenanästhesie als Hinweis auf eine Cauda-Symptomatik, verursacht durch einen medialen Prolaps (meist Massenprolaps) mit Kompression der Cauda equina, besteht eine absolute Operationsindikation. Die Symptomatik ist durch beidseitige radikuläre Schmerzen mit vorausgehender wechselnder Seitenbetonung und Ausfall sensibler, motorischer und vegetativer Funktionen gekennzeichnet. Es können schlaffe Paraparesen oder Paraplegien mit Reflexausfällen bei negativen Pyramidenbahnzeichen auftreten. Die Stuhlinkontinenz ist durch den Ausfall des M. sphincter ani externus bei erloschenem Analreflex bedingt. Außerdem besteht eine Beckenbodenparese mit atoner Überlaufblase [40]. Nicht nur Protrusion und Prolaps von Bandscheibengewebe, sondern auch andere Deformitäten, die direkt oder indirekt im Zusammenhang mit der Bandscheibendegeneration auftreten, können ein lumbales Wurzelsyndrom verursachen.

1.5.4. Postnukleotomiesyndrom

Als Postnukleotomiesyndrom werden die nach einer Operation im lumbalen Bandscheibenbereich länger anhaltenden Beschwerden bezeichnet. Hervorgerufen wird dies durch Segmentinstabilität und Verwachsungen im Wirbelkanal. Ätiologisch spielt, neben individueller Disposition und Höhenminderung des Zwischenwirbelabschnitts durch Entfernung von Bandscheibengewebe, die Entwicklung von narbigen Verwachsungen im Operationsbereich eine entscheidende Rolle. Die Verwachsungen werden unter anderem durch bindegewebige Organisation von Blut und Wundsekret im Epiduralraum hervorgerufen. Auch Dura- und Nervenstrukturen im Subarachnoidalraum können in der Funktion beeinträchtigt werden [41]. Pathologisch-anatomisch entsteht als Folge einer lokalen Arachnoiditis und Radikulitis eine perineurale Fibrose in der Umgebung der Nervenwurzeln. Durch die starren narbigen Verbindungen zwischen den Nervenwurzeln und ihrer Umgebung überträgt sich jede Konsistenz- und Formveränderung der Bandscheibe auf die gereizte Nervenwurzel. Hierdurch führen schon geringste intradiskale Massenverschiebungen zu heftigsten radikulären Beschwerden und Ausfallserscheinungen. Mit der postoperativen Höhenminderung verstärkt sich die Kraftübertragung auf die Wirbelgelenke, welche teleskopartig ineinander geschoben werden. Zudem verengt sich der laterale Wirbelkanal im Bereich der Nervenwurzeln. Die Instabilität verursacht knöcherne Appositionen an den Wirbelkanten und Gelenkfacetten. Hierdurch wird der Reserveraum für nervale Strukturen zusätzlich eingeengt. Klinische Symptome treten in der Mehrzahl der Fälle meist erst nach einem beschwerdefreien Intervall von mehreren Monaten auf. Es besteht ein chronischer Reizzustand der Nervenwurzeln mit einem gemischten pseudoradikulären und radikulären, häufig auch doppelseitigen klinischen Beschwerdebild. Die Beschwerden sind nicht zwingend die Folge einer fehlerhaften Operation, sondern können auch nach einer normal verlaufenen Bandscheibenoperation auftreten [2].

1.6. Pathogenese vertebragener Schmerzen

Schmerz ist ein Phänomen, das in der ärztlichen Praxis auf mehrfache Art und Weise von Bedeutung ist: Zum einen können Schmerzen als Folge eines krankhaften Prozesses auftreten und somit dem Patienten als Warnsignal und dem Arzt als Symptom einer zu behandelnden Krankheit dienen. Zum anderen kann das sich manifestierende Schmerzerlebnis auch auf einer Schädigung des neuronalen Systems beruhen, das nozizeptive Impulsaktivität verarbeitet, so dass Schmerz hier nicht als Symptom, sondern als eigene Krankheitseinheit aufzufassen ist. Diese zwei Aspekte des Schmerzes gehen fließend ineinander über und können daher häufig nicht klar voneinander getrennt werden [42]. Schmerzreize werden nicht zusammen mit somato- oder viszerosensiblen afferenten Reizen in identischen Nervenfasern oder -fasergruppen in das zentrale Nervensystem geleitet, sondern haben einen eigenen Ursprung an eigenen Rezeptoren, den Nozizeptoren. Sie werden in eigenen, abgegrenzten

Bahnen in das ZNS weitergeleitet. Nozizeptoren sind in fast allen Organen reichlich als freie Nervenendungen vorhanden und stellen zahlenmäßig die mit Abstand stärkste Gruppe von Rezeptoren des somatosensorischen Systems dar [42]. Nozizeptoren sprechen normalerweise erst auf starke mechanische oder thermische Reize an, wie zum Beispiel Nozizeptoren der Gelenkkapsel auf Überbeanspruchung eines Gelenkes. Hierbei spielt die Sensibilisierung von Nozizeptoren durch körpereigene chemische Substanzen eine nicht zu unterschätzende Rolle. Vor allem Entzündungsvorgänge unterschiedlichster Genese (traumatisch, infektiös, immunologisch) führen verstärkt zu einer Sensibilisierung von Nozizeptoren mit erhöhter Bildung und Freisetzung von endogenen chemischen Substanzen wie zum Beispiel Bradykinin, Histamin, Prostaglandinen oder Interleukin-1 im Rahmen der humoralen Entzündungskomponente. Die zelluläre Entzündungskomponente ist vor allem durch die Aktivierung der Makrophagen (z.B. durch Lymphokine) geprägt, bei der von diesen Prostaglandine, Leukotriene und Zytokine gebildet werden. Diese vermitteln ihrerseits die Entzündungsreaktion an andere Zellen (Endothel, Fibroblasten) weiter. In Tierexperimenten zeigte sich, dass all diese Entzündungsmediatoren einerseits Nozizeptoren selbst erregen können, aber auch deren Erregungsschwelle bei gleichzeitigem Einwirken mehrerer Stoffe herabsetzen. Im Rahmen dieser Sensibilisierung kommt es zu einer überadditiven Potenzierung der Wirkungen. Dies ist anhand des Zusammenwirkens von Entzündungsmediatoren wie z.B. Prostaglandin E2 und Bradykinin bereits mehrfach untersucht und belegt worden [43] [42]. Im Zuge eines entzündlichen Geschehens sind jedoch nicht alle im Entzündungsbereich vorhandenen Nozizeptoren bereits aktiv. Viele von ihnen werden erst sekundär im Rahmen der humoralen und zellulären Entzündungsreaktion aktiv. Diese Erkenntnisse wurden experimentell unter anderem dadurch bestätigt, dass gezeigt werden konnte, dass bei einer Gelenkentzündung die Nozizeptoren des Gelenkes infolge der Sensibilisierung bereits durch geringe Gelenkbewegungen aktiviert werden, und weitere Nozizeptoren erst bei einer floriden Entzündung erregbar werden, also zu Beginn "stumm" sind [42]. Die Schmerzleitung erfolgt von den freien Nervenenden afferenter Aδ- und C-Fasern zu Rückenmark und Hirnstamm, wo eine Umschaltung auf zentrale Neurone erfolgt und ein Großteil der Schmerzreize weiter im Tractus spinothalamicus im Vorderseitenstrang verläuft. Im Hirnstamm erfolgt dann die Integration der Schmerzinformationen in die Steuerung von Kreislauf und Atmung, Beeinflussung des ARAS (aufsteigendes retikuläres aktivierendes System), sowie von deszendierenden Hemmungssystemen mit Einfluss auf die endogene Schmerzkontrolle und -wahrnehmung. Ein weiterer Teil der Schmerzinformationen gelangt anschließend in den Thalamus. In den lateralen Thalamuskernen werden die Reize weiter zum somatosensorischen Kortex geleitet. Von den medialen Thalamuskernen erfolgt die Weiterleitung der Reize zum limbischen System, zur Hypophyse und zum Hypothalamus [44].

Lange Zeit ging man davon aus, dass der radikuläre Schmerz allein durch die Nervenkompression, zum Beispiel infolge eines Bandscheibenvorfalls, verursacht wird [6] [4]. Allerdings gibt es sowohl Patienten mit starker Radikulopathie, bei denen sich mittels Myelographie keine deutliche Nervenkompression darstellen lässt, als auch Patienten, die trotz deutlicher mechanischer Kompression der

Nerven keine, oder nur eine geringe, Symptomatik aufweisen [45]. Aus diesem zum Teil starken Auseinanderweichen zwischen der berichteten Klinik und dem erhaltenen radiologischen Befund ließ sich daher schlussfolgern, dass neben mechanischen auch nicht-mechanische Mechanismen bei der diskogenen Schmerzentstehung beteiligt sein müssten [5]. Hierbei scheint es sich vor allem um proteinbiochemische Mechanismen zu handeln. Eine wichtige Rolle scheinen hierbei unter anderem die Substanz P und Zytokine zu spielen, aber auch Proteine, die am Matrixaufbau und -abbau beteiligt sind [5] [46] [47] [4].

Bis heute ist jedoch sehr wenig über die genauen biochemischen und pathophysiologischen Mechanismen bekannt, die den radikulären und pseudoradikulären Schmerzen zugrunde liegen. Die Hauptursache dafür liegt im wesentlichen darin, dass sich in jedem Bewegungssegment der Wirbelsäule ein komplexes System nozizeptiver Afferenzen aus der Wirbelsäule, den Muskeln, der Haut, dem Becken und aus den unteren Extremitäten mit einer komplexen, multisegmentalen Vernetzung befindet und dass demzufolge eine wissenschaftliche Untersuchung der Ursache sehr komplex ist. Zum einen lassen tierexperimentelle Studien nur bedingt auf den Menschen übertragbare Ergebnisse erwarten, und zum anderen ist der Schmerz als individuelle Erfahrung wissenschaftlich schwer objektivierbar und zu messen. Daher stammen die meisten verlässlichen Daten hauptsächlich aus der klinisch-chirurgischen Praxis. In jedem Bewegungssegment der Lendenwirbelsäule gibt es sechs verschiedene Schmerzquellen (Tabelle 1), die neben der sympathischen Innervation aus den Ganglien des Rumpfes im wesentlichen von zwei segmental angeordneten Nerven versorgt werden: dem Nervus sinuvertebralis und vom Ramus posterior des Nervus spinalis [18] [48] [49].

Bandscheibe (Anulus fibrosus)	Nervus sinuvertebralis
Ligamentum longitudinale posterius	Nervus sinuvertebralis
Ligamentum flavum	Nervus sinuvertebralis Ramus medialis des Ramus posterior Nervi spinalis
Ligamentum interspinosum	Ramus medialis des Ramus posterior Nervi spinalis
Dura mater: Duralsack, Nervenwurzeltasche	Nervus sinuvertebralis
Periost, Knochengewebe	Nervus sinuvertebralis Ramus medialis des Ramus posterior Nervi spinalis sympathische Fasern
Gelenkkapsel	Nervus sinuvertebralis Ramus medialis des Ramus posterior Nervi spinalis

Tab. 1: Schmerzquellen des vertebragenen Bewegungssegments mit dazugehöriger sensibler Innervation:

1.7. An der Bandscheibendegeneration beteiligte proteinbiochemische Mechanismen

1.7.1. Substanz P

Tachykinine sind kleine Neurotransmitter-Peptide, deren gemeinsames Merkmal die Aminosäuresequenz am Carboxy-terminalen Ende ist. Die drei bedeutendsten Tachykinine sind die Substanz P (SP), Neurokinin A (NKA) und Neurokinin B (NKB). SP leitet sich durch alternatives Spleißen von dem Vorläufer-Gen Preprotachykinin A (PPT-A) (15 kDa) ab, das für SP, NKA, Neuropeptide K und Neuropeptide γ codiert [50]. SP besteht aus 11 Aminosäuren [51] und wurde als erstes Peptid der Tachykinin- Familie 1931 von v. Euler und Gaddum entdeckt [52]. SP-artige Immunreaktivität ist weit verbreitet, wobei sich der überwiegende Anteil von SP neben CGRP (Calcitonin gene-related peptide) in den sensiblen C-Fasern des ZNS und PNS sowie im Gastrointestinaltrakt (GIT) befindet [53]. SP konnte aber auch in nichtneuronalem Gewebe nachgewiesen werden, wie z.B. in Endothelzellen [54] [55] [56] und in Eosinophilen [57]. Tachykinine agieren mit Neurokin-Rezeptoren (NK1, NK2 und NK3), wobei SP die stärkste Affinität zum NK1-Rezeptor besitzt [17]. Die Rezeptoren gehören zu der Superfamilie der G-Protein-gekoppelten, metabotropen Rezeptoren. NK1-Rezeptoren sind vor allem im ZNS (Striatum, Rückenmark) sowie in peripheren Organen (Gastrointestinaltrakt (GIT), Urogenitaltrakt (UGT)) gefunden worden [58].

Im ZNS hat SP eine neuromodulatorische Rolle [50] [59]. Es übt seine Funktionen durch Reduktion der Repolarisationsphase im Aktionspotential aus, das zu einer erleichterten Depolarisation der neuronalen Membranen führt [60] [61].

Als Neurotransmitter hat SP neben nozizeptiver Funktion auch barorezeptive und chemorezeptive Funktionen. SP wird durch mechanische, chemische, entzündliche sowie exzitatorische Reize aus den Nervenendigungen freigesetzt und vermittelt über sensible Fasern die Schmerzleitung [62] [48]. Völlige Entleerung von SP aus sensiblen Nervenfasern durch Capsaisin (Extrakt der roten Chili) führt zum Fehlen einer spezifischen Schmerzantwort.

SP löst direkt eine lokale Entzündungsreaktion mit Plasmaextravasation, auch neurogene Inflammation genannt, aus und führt durch Freisetzung von Histamin aus Mastzellen zu Vasodilatation mit Rubor [62]. SP scheint ebenfalls eine wichtige Rolle bei der chronischen Entzündungsreaktion zu spielen. So ist z.B. die Dichte der NK-Rezeptoren in Glianarben des ZNS bei Multipler Sklerose gegenüber gesundem Gewebe um das 1000-2000-fache erhöht [63]. Durch verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen kann SP dosisabhängig die Adhäsion von Leukozyten an Epithelzellen induzieren [64]. Auch die Sekretion von Entzündungsmediatoren wie z.B. TNF-α, IL-1 und IL-6 aus peripheren Monozyten kann durch SP stimuliert werden. Des weiteren kann SP direkt die IL-1-Freisetzung aus Astrozyten bewirken [62] [50].

Durch Hydrolyse kann SP in verschiedene Fragmente gespalten werden, die eine verantwortliche Rolle bei der Entzündungsreaktion (Freisetzung von Mediatoren und bei der Inhibition der Concana-

valin-A-(Con-A)-indizierten Immunantwort [65] spielen. Sowohl SP als auch sein Spaltprodukt SP7-11 erhöhen die Freisetzung des Prostaglandins PGE2 [62] [66] und sorgen somit für eine Sensibilisierung der Nozizeptoren.

Bei der schmerzhaften Bandscheibendegeneration scheint SP eine wichtige Rolle zu spielen. SP konnte neben CGRP als Neurotransmitter der in den degenerierten Anulus hineinwachsenden neuen Nervenfasern identifiziert werden [50]. Imasoto *et al.* [67] entdeckte außerdem eine signifikant höhere Konzentration von SP im Liquor von Patienten, die an einer degenerativen Wirbelsäulenerkrankung litten, als im Liquor von gesunden Kontrollpatienten. Er stellte zusätzlich eine Korrelation zwischen der SP-Konzentration und der Schmerzintensität fest.

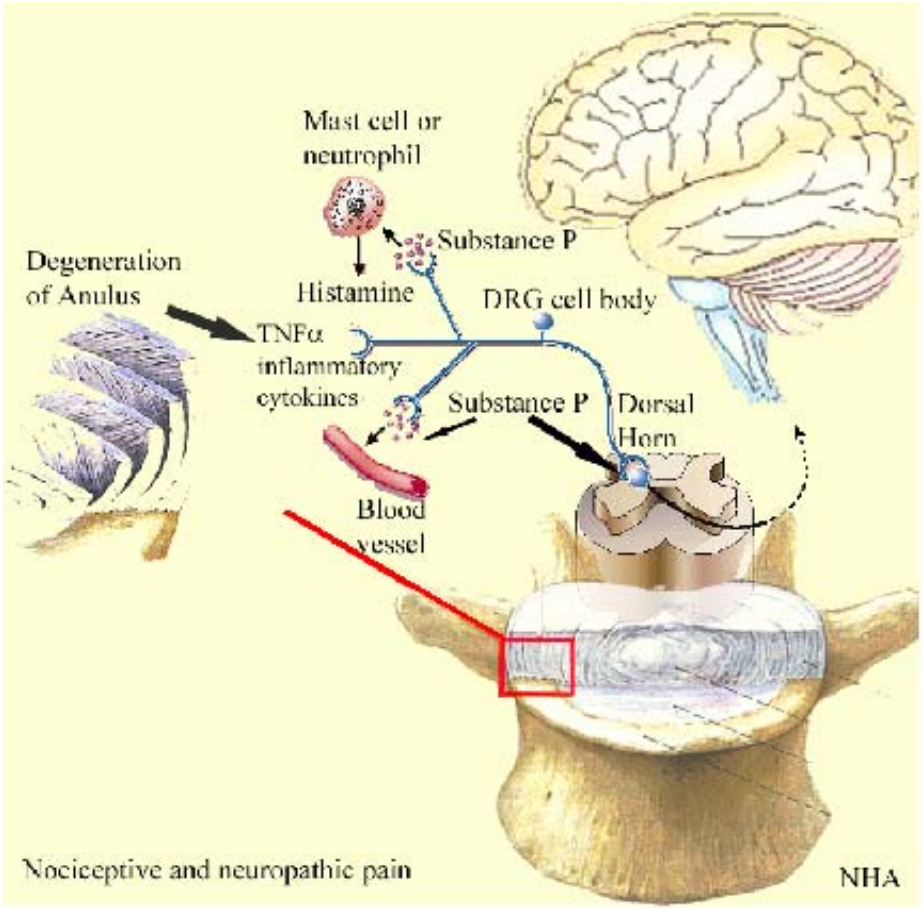


Abb. 3: Darstellung der Schmerzmodulation und Verarbeitung.

1.7.2. Proinflammatorische Zytokine: TNF-α, IL-1α und IL-6

Zytokine sind Polypeptide mit regulatorischen Wirkungen auf Immun- und Entzündungszellen. Für das Entzündungsgeschehen sind die Faktoren TNF-α, IL-1α, IL-6, IL-8 und Interferon (IFN-γ) von besonderer pathobiochemischer Bedeutung [4]. Die quantitative Bestimmung dieser Faktoren zeigte in biologischen Proben erhöhte Konzentrationen bei einer Reihe von infektiösen Zuständen, akuten und chronischen Entzündungsprozessen. Generell handelt es sich dabei um eine Vielzahl von Zytokinen, die sich in Form eines kaskadenförmig angeordneten Netzwerks gegenseitig beeinflussen können und so eine komplexe wechselseitige Wirkung ausüben können [4].

Der Tumornekrosefaktor (TNF) existiert in zwei Formen: TNF-α und TNF-β. Beide haben eine starke Homologie und ein sehr ähnliches Aktivitätsspektrum. TNF-α, ein nicht glykolisiertes Protein, wird auf bestimmte Stimuli hin hauptsächlich von aktivierten Monozyten und Makrophagen gebildet. Dabei wird zunächst ein Vorläufer synthetisiert, aus dem dann durch gezielte Proteolyse die aktive 17 kDa-Form gebildet wird. TNF-α besitzt ein breites Wirkungsspektrum und ist als initialer Mediator bei allen Reparaturvorgängen und Keimabwehrprozessen beteiligt [68].
Unter anderem lässt sich eine starke und teilweise ausgeprägte zytotoxische und katabole Wirkung auf das Vorhandensein dieses Zytokins zurückführen. Es gehört zu den wichtigsten Mediatoren beim septischen Schock, führt zu Fieber und beeinflusst Blutgefäße und Gerinnungsfaktoren. Hierbei wirkt es zusammen mit IL-1 synergistisch gerinnungsaktivierend und fibrinolysehemmend. TNF-α bewirkt eine Resorption von Knorpel und Knochen und stimuliert genau wie IL-1α die Bildung von Prostaglandinen und weiteren destruktiven Enzymen [47]. TNF-α verursacht eine endotheliale Adhäsion und Aktivierung von Granulozyten und verstärkt die Expression von HLA-Klasse-I-Antigenen. Das Lymphotoxin TNF-β hingegen wird vor allem von T-Lymphozyten produziert [68].
Im Zusammenhang mit der schmerzhaften degenerativen Bandscheibenerkrankung ist bekannt, dass TNF-α zu einer Kaskade neuropathologischer Veränderungen führen kann, wie zum Beispiel der Schwann-Zell-Aktivierung, Demyelinisierung, Waller-Degeneration und Bildung von endoneuralen Ödemen [46] [69].

Auch Interleukin-1 existiert in zwei Formen mit ähnlichen Funktionen: IL-1α und IL1β. Die Homologie der Aminosäuresequenz beträgt jedoch nur etwa 27 %. Beide Interleukine werden als 35 kDa-Vorstufen produziert (IL-1α in einer aktiven, IL-1β in einer inaktiven Form), und anschließend durch Proteasen enzymatisch in ihre Wirkformen gespalten.
IL-1α entfaltet vermutlich seine Wirkung primär als membrangebundenes Molekül und wirkt damit indirekt über Zellkontakt. IL-1β ist die Hauptform, die vor allem von Monozyten/Makrophagen freigesetzt wird und wirkt als lösliches Molekül in der Zelle. IL-1 hat vielfältige Effekte an den verschiedenen Gewebearten. Heute gilt als gesichert, dass das Interleukin-1 sowohl eine systemische

als auch eine lokale Wirksamkeit besitzt. Durch die systemische Wirksamkeit greift das Zytokin auf vielfältige Art und Weise in die physiologischen Regulationsvorgänge des Zentralen Nervensystems, des Stoffwechsels, des Knochenmarks und der Gefäßwandzellen ein.
Zu den lokalen Effekten von IL-1 gehört unter anderem eine Induktion von B- und T-Lymphozyten. IL-1 steigert die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten und die Aktivierung von Endothelzellen.
IL-1, sowie TNF-α, veranlasst synoviale Zellen, Chondrozyten und Fibroblasten zu einer Sekretion von Proteasen, wie Kollagenasen, Elastasen, die zu einer Degeneration und zu einem Zusammenbruch der Bindegewebsmatrix führen [9]. Zusätzlich bewirkt IL-1, etwa 100-fach stärker als TNF-α, eine Destruktion der Proteoglykane. IL-1β zum Beispiel hat eine induzierende Wirkung auf die Expression von mRNA für Metallproteinasen und reduziert die Transkription für Aggrecan [3]. Die IL-1β Produktion im arthrotischen Gewebe korreliert mit dem Stadium der Knorpeldegeneration [70].
An entzündlichen Reaktionen beteiligt sich IL-1, wie auch TNF-α, durch die Stimulierung der Synthese und Sekretion sekundärer proinflammatorischer Zytokine wie z.B. IL-6, IL-8 und IL-10, aber auch IL-1 und TNF-α selber [71]. Außerdem bewirkt IL-1, wie schon oben erwähnt, eine Induktion der Prostaglandine (PGE2) [4].
Das Interleukin-1 ist um ein Vielfaches potenter als TNF-α. Beide Zytokine können unter bestimmten Voraussetzungen synergistisch miteinander agieren, wobei allerdings die Produktion und Wirkung des IL-1 zumindest kurzfristig von TNF-α induziert und reguliert wird.

Interleukin-6 (IL-6) ist ein Glykoprotein, welches je nach Ursprungszelle ein Molekulargewicht von 21 bis 28 kDa aufweist und eine signifikante Homologie zum Granulozyte-colony-stimulating-factor (G-CSF) zeigt. Viele vormals einzeln benannte Mediatoren verschiedenster Funktion, wie z.B. B-Cell-stimulatory-factor-2 (BSF-2), Interferon-β2 oder Hepatocyte-stimulating-factor (HSF), stellten sich letztendlich als identisch mit IL-6 heraus. Weiterhin ist IL-6 als ein „Vielzellenprodukt“ mit verschiedensten Triggern aufzufassen. Als Hauptquellen werden stimulierte Monozyten/Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen angesehen, aber auch T-/B-Lymphozyten, Kochenmarkzellen, Mastzellen, neutrophile Granulozyten, Osteoblasten oder Astrozyten sezernieren diesen Mediator. IL-6 vermittelt über unterschiedlichste Zielzellen vielfältige biologische Funktionen, wobei je nach betroffenem Zelltyp inhibitorische oder stimulierende Effekte zum Tragen kommen. IL-6 hat vor allem proinflammatorische Eigenschaften, da es ein potenter Induktor von sogenannten „Akute Phase Proteinen“ (APP), Fieber und Leukozytose ist. Gleichzeitig aktiviert es das Komplement- und Gerinnungssystem [72]. Einige antiinflammatorische Wirkungen von IL-6 sind beispielsweise die Inhibition der TNF-α-Expression von Astrozyten sowie die Induktion des löslichen TNF-α-Rezeptor und IL-1-Rezeptor-Antagonist [73]. Bei B-Lymphozyten agiert IL-6 in der späten Phase der Differenzierung zu immunglobulinproduzierenden Plasmazellen und induziert die Immunglobulinsekretion. Es ist außerdem beim Wachstum und der Differenzierung von T-Lymphozyten beteiligt.

Hierbei wirkt IL-1 als Kofaktor der Proliferation. IL-6 erhöht die Aktivität von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und stimuliert die Phagozytosefähigkeit und funktionelle Differenzierung bei Makrophagen. Auch IL-6 induziert die Biosynthese der Akute-Phase-Proteine wie CRP, Serum-Amyloid-A, Fibrinogen und Antithrombin in der Leber. Dabei potenzieren Glucokortikoide den Effekt dieses Zytokins auf die Induktion mancher APP. Interessanterweise führt IL-6 im Zentralnervensystem neben Fieber auch zur ACTH-Freisetzung. Dadurch sezernierte Glucokortikoide dienen folglich teils als eine Art positives Feedback in der Akute-Phase-Reaktion und teils als negatives Feedback durch ihren depressorischen Einfluss auf die Zytokinproduktion [74].

1.7.3. Bedeutung von TGF-β und MMP-3

Sowohl TGF-β als auch MMP-3 sind an physiologischen Gewebeumbauprozessen beteiligt. Während TGF-β vor allem proliferativ wirkt, hat MMP-3 degenerative Eigenschaften. TGF-β ist ein Polypeptid hauptsächlich thrombozytären Ursprungs. Es wird als latente Vorform sezerniert und anschließend enzymatisch zu einem aktiven, 25 kDa großen Homodimer umgebaut. Von den drei bekannten Isoformen TGF-β1, 2 und 3 überwiegt beim Menschen vor allem TGF-β1.

Neben der Beeinflussung der Zellproliferation und der Förderung des Aufbaus extrazellulärer Matrix (u.a. Reparaturmechanismen, Angiogenese, Fibrogenese, Chondro- und Osteogense) hat TGF-β auch mehrere immunmodulatorische Funktionen [75] [76]. Es dient im Gewebe als Chemoattraktant für Phagozyten und als autokriner Wachstumsfaktor für Monozyten/Makrophagen. Intravasal vorkommendes TGF-β1 hemmt jedoch die Migration von Phagozyten durch die Reduktion endothelialer Adhäsionsmoleküle. Bei Makrophagen, Kardiomyozyten und glatten Muskelzellen kann es die NO-Produktion reduzieren. Als IL-2 Antagonist hat es einen antiproliferativen Einfluss auf das T-Zellwachstum und supprimiert die IL-1 abhängige Lymphozytenproliferation. Des weiteren wird durch TGF-β1 die B-Zellproliferation und -differenzierung gehemmt sowie die Funktion von NK-Zellen blockiert [76] [75].

Alle Metalloproteinasen enthalten ein zentrales Zink-Ion. Sie sind beteiligt bei dem degenerativen Abbau verschiedenster Komponenten der Extrazellulärmatrix. Die wichtigste Rolle bei der Bandscheibendegeneration scheint die Metalloproteinase MMP-3, auch Stromelysin-1 genannt, zu spielen. Neben der Spaltung von Aggrecan spaltet es auch Fibrinonektin, Laminin und verschiedenste Kollagene [77] [9].

MMP-3 wird als latente Vorform (proMMP) unter anderem von Makrophagen, Gefäßzellen und Bandscheibenzellen sezerniert. Durch Plasminogen wird es zur aktiven Form umgewandelt [9] [78]. Es gibt mehrere Angriffspunkte zur Beeinflussung der MMP-3-Synthese. Während eine Vielzahl biologisch aktiver Substanzen wie z.B. bestimmte Hormone, Onkogene, Tumorpromoteren und Zytokine (u.a. TNF-α und IL-1α) die Transkription von MMP-Genen stimulierend beeinflusst, wird sie von

Steroiden, TGFβ und IL-6 gehemmt. Daneben gibt es auch einen natürlichen Hemmer, der die Synthese 1:1 hemmt, das sogenannte TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase). Während IL-1α die TIMP-Synthese hemmt und somit auch auf diesem Wege indirekt die MMP-3-Synthese stimuliert, steigert TGF-β die TIMP-Synthese und hemmt somit wiederum indirekt die MMP-3-Synthese. Untereinander können MMPs ebenfalls stimulierend wirken [79] [9] [80].

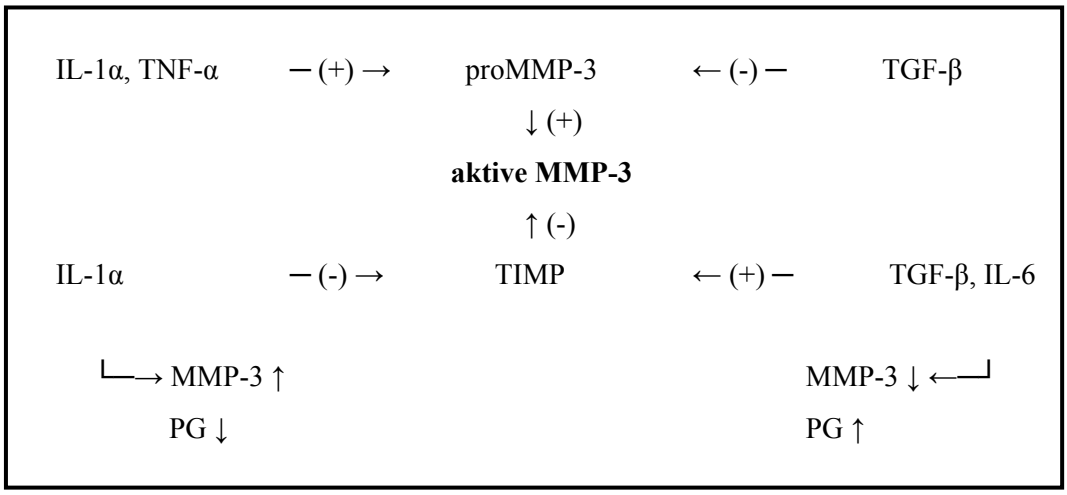


Abb. 4: Stimulation und Inhibation der MMP-3-Synthese (PG = Proteoglykane)

1.8. Fragestellung

Bei der Bandscheibendegeneration und der begleitenden Schmerzentwicklung finden sich sehr komplexe proteinbiochemische Mechanismen. Eine Vielfalt unterschiedlicher Substanzen scheint in diesen Vorgang involviert zu sein. Die vorliegende Studie beschränkt sich auf die Untersuchung der Expression von sechs Substanzen in Bandscheibengewebe, denen eine besondere Funktion bei der algogenen Bandscheibendegeneration zugeschrieben wird. Zu den untersuchten Proteinen gehören die proinflammatorischen Zytokine TNF-α, IL-1α, IL-6, die Substanz P und der Wachstumsfaktor TGF-β, sowie das am Abbau der Bandscheibenmatrix beteiligte Enzym MMP-3.
Die Untersuchung der Expression der oben genannten Substanzen sollte in drei unterschiedlichen Patientengruppen erfolgen. Die erste Patientengruppe setzt sich aus Patienten zusammen, bei denen eine chronisch degenerative Bandscheibenerkrankung mit chronischer Schmerzsymptomatik besteht. Zu der zweiten Gruppe gehören Patienten, bei denen sich ein symptomatischer Bandscheibenvorfall mit Sequestrierung gebildet hat und somit eine akute Schmerzanamnese vorhanden ist. Als Kontrollgruppe wurden Patienten mit einer operationswürdigen Skoliose untersucht.
Ziel der Studie war es, durch die Untersuchung der Proteinexpression mögliche Schlussfolgerungen über Mechanismen der Schmerzentstehung (chronischer und akuter Schmerz) und über Veränderungen der Expressionsmuster der oben genannten Schlüsselproteine im Rahmen chronischer und akuter degenerativer Veränderungen zu erlangen, um hieraus letztendlich mögliche neue Angriffspunkte für neue gezielte Therapien zu erhalten.

Die Fragestellungen waren im einzelnen:

1. Unterscheidet sich das Expressionsmuster von TNF-α, IL-1α, IL-6 und Substanz P in sequestriertem Bandscheibengewebe beim akuten Schmerzsyndrom eines Bandscheibenvorfalles vom Expressionsmuster im Bandscheibengewebe beim chronischen Lumbalsyndrom (Nucleus pulposus und Anulus fibrosus)?

2. Unterscheidet sich die Expression von MMP-3 und TGF-β im Sequester des Bandscheibenvorfalls von der Expression im Nucleus pulposus und Anulus fibrosus des degenerativen Lumbalsyndroms?

3. Ergeben sich aus den gewonnenen Daten der Proteinexpression neue mögliche Ansätze zur Therapie der algogenen Bandscheibendegeneration?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Auswahl des Patientenkollektivs

Das zu untersuchende lumbale Bandscheibengewebe (L4/5, L5/S1) wurde bei Wirbelsäulenoperationen von 45 Patienten mit symptomatischen Beschwerden, wie zum Beispiel einer Radikulopathie oder Lumbalgie, gewonnen (genehmigt von der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg; Bearbeitungsnummer: OB-066/04). Das Patientenkollektiv wurde dabei in drei Gruppen eingeteilt (siehe Tabelle 2).

Zu der ersten Gruppe gehörten 17 Patienten (9 Männer, 8 Frauen) mit einem durchschnittlichen Alter von 51 Jahren (± 3,1) und einem BMI von 28 kg/m² (± 1,1), die unter einer chronisch degenerativen Bandscheibenerkrankung (z.B. Spondylolisthesis, Osteochondrose) litten. Bei diesen Patienten wurden zwecks Stabilisierung der betroffenen Bewegungssegmente benachbarte Wirbelkörper fusioniert. Teile der dazwischenliegenden degenerierten Bandscheiben wurden dabei entfernt und dienten als Untersuchungsmaterial. Vor der Operation wurden mittels MRT und lumbaler Diskografie die potentiell schmerzverursachenden degenerierten Bandscheiben ermittelt. Als Kriterium für eine degenerierte Bandscheibe galt eine Zunahme der T2-gewichteten Signalintensität, die Abnahme der Bandscheibenhöhe und eine positive Diskografie. Dieses Probematerial wurde getrennt nach Anulus fibrosus und Nucleus pulposus. Zu der zweiten Gruppe zählten 15 Patienten (8 Männer, 7 Frauen) mit einem durchschnittlichen Alter von 42 Jahren (± 4,5) und einem BMI von 26 kg/m² (± 1,1), die wegen eines symptomatischen Bandscheibenvorfalls mit Sequesterbildung operiert worden sind. Hierbei wurde der Sequester entfernt und diente als Probematerial. Als Kontrollgruppe diente die dritte Gruppe mit idiopathisch oder posttraumatisch bedingten Skoliosen, die 13 Patienten (2 Männer, 11 Frauen) mit einem durchschnittlichen Alter von 20 Jahren (± 1,3) und einem BMI von 22 kg/m² (± 1,3) umfasste. Bei diesen Patienten wurden zwecks Wirbelsäulenaufrichtung sowohl Knochen der Wirbelkörper als auch Bandscheibengewebe entfernt, das als Untersuchungsmaterial genutzt wurde. Auch dieses Probematerial wurde wieder nach Anulus fibrosus und Nucleus pulposus getrennt.

Die gewonnenen Untersuchungsmaterialien wurden direkt nach der Entfernung in Kryotubes in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend bei –80 °C zur späteren Analyse gelagert.

	1. (chron. deg. BS)	2. (BS-Vorfall)	3. (Kontrollgruppe)
Anzahl	17 (9 M, 8 F)	15 (8 M, 7 F)	13 (2 M, 11 F)
Alter (Jahre)	51 (± 3,1)	42 (± 4,5)	20 (± 1,3)
BMI (kg / m²)	28 (± 1,1)	26 (± 1,1)	22 (± 1,3)

Tab. 2: Patientenkollektiv (M=Männer, F=Frauen)

2.1.2. Reaktionssysteme (Antikörper, Positivkontrollen, ELISA)

Antikörper:

Produkt	Spezifität	Firma	Katalog Nummer
IL-1α	Mensch, Maus, Ratte	Santa Cruz	H-159, sc-7929
IL-6	Mensch	Santa Cruz	H-183, sc-7920
MMP-3	Mensch, Maus, Ratte	Santa Cruz	C-19, sc-6839
SP, PPT-A	Mensch, Maus, Ratte	Santa Cruz	N-18, sc-9758
TGF-β1,2,3	Mensch, Maus, Ratte	Santa Cruz	H-112, sc-7892
TNF-α	Mensch, Maus, Ratte	Santa Cruz	N-19, sc-1350

Positivkontrollen:

nachzuweisender Antikörper:	positiv Kontrolle:	Firma:
IL-1α	IL-1α	Santa Cruz
IL-6	IL-6	Santa Cruz
MMP-3	MMP-3	Santa Cruz
TGF-β1,2,3	TGF-β1	Santa Cruz
TNF-α	TNF-α	Santa Cruz

Immunoassays:

Immunoassay:	Firma:	Katalog Nummer
SP	R&D-Systems	DE-1400
IL-1α	R&D-Systems	DLA-50
IL-6	R&D-Systems	BMS 223/3MST
TNF-α	Bender MedSystems	HS 600B

2.1.3. Verwendete Substanzen, Hilfsmittel, Geräte

Alle Substanzen und Hilfsmittel wurden, soweit nicht anders angegeben, mit der höchsten im Handel erhältlichen Reinheit verwendet.

Substanzen:

Produkt:	Firma:
2-Mercaptoethanol	Sigma
2-Propanol	Merck
40% Acrylamid	BioRad
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
Aprotinin	Sigma
BCA-Protein-Assay	Pierce
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Serva
DTT (Dithiothreiol)	Merck
ECL	Amersham
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma

Ethanol	Merck
Glycerol	Merck
Glycin	Roth
Hepes	Sigma
Hyperfilm	Amersham
Leupeptin	Sigma
Methanol	Merck
Na-Fluorid	Sigma
Na-Phosphat	Sigma
Na-Pyrophosphat	Sigma
Na-Vanadat	Sigma
NaCl	Baker
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma
Protein-A-Sepharose	Pierce
Protein-Ladder (BenchMark-Prestained)	Gibco-BRL
SDS (Natriumlaurylsulfat)	Sigma
Temed	Sigma
TrisBase	Sigma
Triton-X-100	Merck
Tween-20	BioRad

Hilfsmittel:

Produkt:	**Firma:**
Blotting Paper	Schleicher&Schnell
Nitrocellulose	Schleicher&Schnell
Pipetten (Plastik) (5, 10, 25 ml)	Falkon
Pipettenspitzen (10, 20, 100, 1000µl)	Gilson
Reaktionsgefäße / Tubes (0,5, 1,5 ml)	Eppendorf Hamburg

Geräte:

Produkt:	**Firma:**
Schüttler	B.Braun Biotech International
Heizblock	Eppenorf Thermomixer
Zentrifuge, Sigma 3K30	B.Braun Biotech International
Waage	Mettler
Pipetten (10, 100, 1000 µl)	Eppendorf Hamburg
Magnetrührer	Ikamag RCT
Röntgenfilmkassette	Rego
Protein Gelkammern	Bio Rad
pH-Meter	Schott
Semi Dry – Blotgerät	Bio Rad

2.1.4. Zusammensetzung der verwendeten Gele und Lösungen

Lösungen:

Puffer:	**Reagenzien und Konzentrationen:**
Lysispuffer (pH: 7,5 - 7,6)	50 mM Hepes pH 7,6 4 mM EDTA 150 mM NaCl 1 % Triton X 100 200 mM PMSF Aprotinin Leupeptin 2 mM Na-Vanadat 100 mM Na-Fluorid 50 mM Na-Pyrophosphat
Trenngelpuffer	1,5 M Tris Base pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris Base pH 6,8
Runningbuffer	25 mM Tris Base 192 mM Glycin 0,1 % SDS
Semi-Dry-Puffer	48 mM Tris-Base 1,3 mM SDS Glycin 20 % Methanol
TBS Waschpuffer (pH: 7,4)	25 mM Tris Base 137 mM NaCl
TBS/T Waschpuffer (pH: 7,4)	25 mM Tris Base 137 mM NaCl 0,1 % Tween-20
Lämmlipuffern (LSB)	0,01 % Bromphenolblau 50 mM Na-Phosphat 50 % Glycerol 10 % SDS

SDS-Polyacrylamide-Gel:

Trenngel (15 %)	40 % Acrylamid Trenngelpuffer 10 %-iges SDS 10 % -iges APS Temed
Sammelgel (4 %)	40 % Acrylamid Sammelgelpuffer 10 %-iges SDS 10 % -iges APS Temed

2.2. Methoden

2.2.1. Aufbereitung der Proben

Jeweils 300 mg des bei –80 °C gelagerten Bandscheibengewebes wurden mit etwa 1,2 ml Lysispuffer zur Denaturierung vermischt und mit einem Ultraturrax-Hexler homogenisiert. Anschließend wurden die Proben für 15 min auf Eis gelagert und dann bei 4 °C und für 30 min bei 10.000 U/min zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde in kleinere Tubes überführt und bei –20 °C eingefroren.
Der Gesamtproteingehalt der Homogenate / Lysate wurde mit einem BCA-Protein-Assay (Pierce, IL, USA) nach der Methode von Bradford [81] bestimmt. Die Quantifizierung der Proteine beruht auf einer Messung der Farbveränderung von Coomasie Brilliant Blue G-250 in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. Bei der durchgeführten Proteinbestimmung wurde mit Hilfe von Rinderserumalbumin (BSA) als Standardsubstanz eine Kalibrierungsgerade erstellt. Die Proteinproben wurden mit Aqua dest. und BCA-Reagenz bei 37 °C für 30 min inkubiert (je 1 µl Probe + 9 µl H2O + 200 µl BCA). Anschließend wurde die Extinktion der Proben durch photometrische Messung bei 540 nm im Elisareader bestimmt und mit Hilfe der EXCEL-Datenverarbeitung ausgewertet. Sämtliche Messdaten sind Mittelwerte aus einer Dreifachbestimmung.
Zur Herstellung von Lysaten zur weiteren Aufarbeitung der Proben wurden jeweils 100 µg Protein auf 20 µl mit Lysispuffer aufgefüllt, mit je 5 µl Lämmlipuffer (LSB) und DTT versetzt und anschließend 5 min bei 100 °C im Thermomixer aufgekocht und gemischt. Die warmen Lysate wurden auf SDS-Gele geladen oder zu einer späteren Verwendung bei –20 °C eingefroren.
Um kleinste Proteinmengen darzustellen, wurde das Verfahren der Immunpräzipitation (IP) angewandt. Hierbei wurden aus einer größeren Ausgangsmenge (1000 µg Protein) die gesuchten Proteine herausgefiltert. Sämtliche Arbeitsschritte zur Erstellung der Immunpräzipitate wurden auf Eis, bzw. bei 4° C durchgeführt. Zuerst wurden je 1000 µg Protein mit Lysispuffer auf 500 µl aufgefüllt und mit 2 µg (=10 µl) Antikörper (in diesem Fall IL-1α oder IL-6) und 80 µl Protein-A-Sepharose versehen, und zwei Stunden bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Die entstandenen Konjugate wurden bei 14.000 U/min 1 min zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgesaugt und die pelletierten Beads mit 1 ml Lysispuffer dreimal gewaschen (jeweils nach der Lysispufferzugabe zentrifugiert und der Überstand wurde anschließend abgesaugt). Zuletzt lagen die trockenen Bead-Pellet vor, die mit je 15 µl Lämmlipuffer und DTT versehen wurden und 5 min bei 100° C denaturiert wurden. Anschließend wurden die Proben erneut für 1 min zentrifugiert und der entstandene Überstand in die Taschen der SDS-Gele pipettiert.

2.2.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur semiquantitativen Bestimmung der relativen Proteinexpression von TNF-α, IL-1α, IL-6, MMP-3, TGF-β1,2,3 und der Vorform von Substanz P (PPT-A) im Bandscheibengewebe führten wir Westernblots nach Standardprotokoll durch.

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe wurde mit Hilfe der Gelelektophorese (SDS-PAGE) in Minigelkammern der Firma BioRad durchgeführt. Hierbei wurde die elektrophoretische Beweglichkeit der Proteine unter denaturierten Bedingungen genutzt, unter denen die negativ geladenen SDS-Polypeptid-Komplexe, proportional dem Logarithmus ihrer Masse, zur Anode wandern (Reynolds, Tanford 1970). Hierfür wurde ein 15 %iges Polyacrylamid-Trenngel, das von 4 %igem Sammelgel (Laemmli 1970) überschichtet wurde, verwandt. Als Größenstandard wurde in eine der 10 Geltaschen ein Referenzprotein definierter Größe aufgetragen. Um eine gleichmäßige Taschenfüllung (je 30 µl) und ein dadurch resultierendes gleichmäßiges Durchwandern der Proben durch die Gele zu erreichen, wurden die 10 µl des Größenstandards mit 10 µl Lysispuffer und je 5 µl LS-Bund DTT versetzt. Zum gleichmäßigen Sammeln der Proben im oberen Bereich des SDS-Gels wurde die Gelelektrophorese zunächst für 30 min bei 80 V und anschließend zur Größentrennung im elektrischen Feld für 120 min bei 120 V durchgeführt.

Die nach ihrer Größe gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden anschließend mittels Semi-Dry-Blot Verfahren auf eine Nitrocellulose-Membran überführt und dort fixiert.

Hierzu wurde das SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran gespannt und in einer Blotvorrichtung (Fa. Biorad) justiert. Die in dem Gel aufgetrennten Proteine wurden anschließend durch eine Stromstärke von 400 mA über eine Dauer von 25 min auf einer Nitrocellulosemembran fixiert. Zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrocellulosemembran über Nacht bei 4 °C in 25 ml 3 % BSA/TBST-Lösung zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen geblockt. Nach dreimaligem Waschen in TBST-Lösung wurde die Membran mit einer für das zu untersuchende Protein spezifischen Antikörperlösung für 2 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert.

Für die Antikörperlösung wurden 10 µl Antikörper (TNF-α, MMP-3, IL-1α, IL-6, Substanz P; Verhältnis 1:1000) bzw. 50 µl (TGF-β1,2,3; Verhältnis 1:200) in 10 ml 1 %BSA/TBS/T angesetzt.

Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper wurde der Blot für je 5 min zuerst mit TBS, anschließend mit TBS/T und schließlich wieder mit TBS gewaschen.

Die Inkubation mit einem sekundären Antikörper, der eine enzymatisch aktive Peroxidase aufweist, erfolgte über 60 min auf einem Schüttler bei Raumtemperatur. Das Mischungsverhältnis betrug 1:5000. Dies entspricht 2 µl anti-goat (bei TNF-α, MMP-3, Substanz P) bzw. 2 µl anti-rabbit (bei IL-1α, IL-6, TGF-β1,2,3) in 10 ml 1 %BSA/TBS/T.

Nach erneutem Waschen mit TBS, TBS/T und TBS, um nicht gebundene Antikörper von den fixierten Proteinen zu entfernen, erfolgte die Detektion der Banden mit dem ECL-Detektionssystem. Hierbei

führt die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase im Bereich der detektierten Proteine durch die Oxidation von Luminol zu einer Chemilumineszenzreaktion (Kricka 1991, Fowler 1995). Unmittelbar nach dieser Reaktion befindet sich das Luminol in einem angeregten Zustand und emittiert beim Zurückkehren in den Grundzustand Licht. Die katalytische Aktivität der Peroxidase und Entstehung von Chemolumineszenz kann daher durch die Auflagerung eines Röntgenfilms auf die Nitrocellulosemembran und anschließende Entwicklung des Films dokumentiert werden. Die Expositionszeit lag zwischen 10 s und 20 min. Ein Blot wurde mit 2,5 ml ECL-Lösung-1, 2,5 ml ECL-Lösung-2 und 5 ml H2O für eine Minute auf dem Schüttler inkubiert.

2.2.3. Enzymimmunoassay

Der quantitative Nachweis der aktiven 11 kDa-Form von Substanz P erfolgte mittels ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay). Die semiquantitativ ermittelte relative Proteinexpression von TNF-α, IL-1α und IL-6 wurde ebenso mit Hilfe eines ELISA überprüft.

In der vorliegenden Studie wurden sowohl kompetitive (für SP) als auch nichtkompetitive ELISA´s gemäß der Anleitung des jeweiligen Herstellers verwendet.
Die dem ELISA zugrundeliegende Technik ist die sogenannte "Two-Site-" bzw. die "Sandwich-Technik". Hierbei ist die in dem Reaktionssystem enthaltene Mikrotiterplatte mit einem im Überschuß vorliegenden monoklonalen Antikörper gegen die zu untersuchende Substanz beschichtet; dies entspricht dem primären Antikörper. Die Standard- und Probenlösungen werden in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert und reagieren mit dem 1. Antikörper. Beim kompetitiven Substanz P-Immunoassay wird zusätzlich eine bereits mit Peroxidase konjugierte Substanz P hinzugefügt und der nachfolgende 4. und 5. Schritt übersprungen. Die unkonjugierte Substanz P bindet dabei besser an den 1.Antikörper als die konjugierte Substanz P. Nach Abschluss der Reaktionen werden überschüssige Bestandteile der Proben durch Waschen entfernt. Nach Zugabe von mit Peroxidase (HRP) markierten polyklonalen Antikörpern (2. Antikörper) kann sich in einer anschließenden Intubation ein Sandwich-Komplex aus dem 1. Antikörper, der zu untersuchenden Substanz in der Probe und dem enzymmarkierten 2. Antikörper bilden. Überschüssiger Antikörper wird durch einen Waschschritt entfernt und ein H_2O_2 enthaltendes Substrat (chromogene Lösung: Tetramethylbenzidin= TMB) hinzugefügt, das sich an die Peroxidase bindet und dabei eine Farbreaktion auslöst. Diese Reaktion wird durch Zugabe einer Säurelösung, der sogenannten Stop-Solution beendet. Beim nichtkompetitiven ELISA ist die Farbintensität derjenigen Menge der zu untersuchenden Substanz in der Probe oder im Standard proportional. Beim kompetitiven ELISA ist die Farbintensität hingegen der Menge umgekehrt proportional. Die Absorption des farbigen Endproduktes wird bei 405 nm gemessen und ausgewertet.

Die Bestimmung von IL-1α im Bandscheibengewebe wurde mit dem Human IL-1α Immunoassay von R&D-Systems durchgeführt. Hierzu wurden 100 µg Protein als entsprechende Lysatmenge mit ASSAY Diluent RD1C bis 200 µl ergänzt und in die mit dem 1. Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 3 x mit je 400 µl Waschpuffer gewaschen und 200 µl Anti- IL-1α- HRP Konjugat hinzugefügt. Die Proben wurden 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, 3 x mit je 400 µl Waschpuffer gewaschen und 200 µl Substratlösung (Color Reagent A) hinzugefügt und für 20 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Nach dem Hinzufügen von 50 µl Stopplösung wurde die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 30 min gemessen und die Ergebnisse ausgewertet.
Die Bestimmung von IL-6 und Substanz P im Bandscheibengewebe wurde mit dem Immunoassay von R&D-Systems durchgeführt. Die Durchführung war bis auf geringe Unterschiede in der Menge der verwendeten Substrate identisch mit der Bestimmung von IL-1α im Bandscheibengewebe.
Die Bestimmung von TNF-α im Bandscheibengewebe wurde mit dem TNF-α ELISA von Bender MedSystems durchgeführt. Hierbei wurde eine Mikrotiterplatte Nunc (Maxi sorb) über Nacht mit dem 1. Antikörper (2,5 µg/ml) und 100 µl "Coating" –Lösung inkubiert, 250 µl Probenpuffer hinzugefügt, die Lösung für 2 h bei Raumtemperatur geblockt und 100 µg Protein als entsprechende Lysatmenge mit Probenpuffer bis 200 µl ergänzt und in die nun mit dem 1. Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurden die Proben 2 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert, 4x mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen, 100 µl Streptavidin-HRP Konjugat hinzugefügt und für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Die Probe wurde dann 4 x mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen, 100 µl Substratlösung (TMB) hinzugefügt, für 15 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler lichtgeschützt inkubiert und 100 µl Stopplösung hinzugefügt. Die Extinktion wurde bei 450 nm innerhalb von 30 min gemessen.

2.2.4. Auswertung und EDV

Die densitometrische Messung und Auswertung der Banden im Western-Blot erfolgte durch Einscannen der Blots, Bearbeiten und Beschriften der Bilder in Photoshop® und anschließender Auswertung mit NIH-Image® und EXCEL®.
Die Messung der Intensität der Farbreaktion des ELISA wurde mit einem ELISA-Reader gemessen und mit Hilfe der EXCEL®-Datenverarbeitung ausgewertet, wobei sämtliche Messdaten Mittelwerte aus einer Doppelbestimmung waren.
Es handelt sich jeweils um Mittelwerte, die in Relation zur Kontrollgruppe gesetzt wurden, wobei die Werte der Kontrollgruppe gemittelt wurden und gleich 1 gesetzt wurden. Werte des Anulus fibrosus der chronisch degenerativen Bandscheibenerkrankungen wurden dabei mit dem Anulus der Skoliose-Patienten verglichen, die als Kontrollgruppe dienten. Entsprechend wurden Werte des Nucleus pulpo-

sus der chronisch degenerativen Bandscheibenerkrankungen mit den Werten des Kontroll-Nucleus verglichen. Aus dem Sequestermaterial ermittelte Werte wurden ebenso mit dem Kontroll-Nucleus in Relation gesetzt, da der Sequester aus Nucleus-Gewebe besteht.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test. Die Signifikanzgrenze wurde bei $p<0,05$ festgelegt.

3. ERGEBNISSE

Der Nachweis der verschiedenen Zytokine in den unterschiedlichen Bandscheibenbereichen der drei Patientenkollektive gelang nach Konservierung der Proben bei –80 °C und anschließender Aufbereitung zu Lysaten. Hierzu erfolgte eine Denaturierung durch die Zugabe eines Lysispuffers und die anschließende Homogenisierung mit Hilfe des Ultraturrax-Hexler. Der Gesamtproteingehalt der einzelnen aufbereiteten Bandscheibenproben konnte mit Hilfe von Western-Blots semiquantitativ nachgewiesen werden. Die Vorformen und korrespondierenden aktiven Formen der einzelnen Proteine in unterschiedlicher Größe konnten als klare Banden dargestellt werden. Im einzelnen fanden sich die Banden folgender Proteine:
Substanz P - Vorform (15 kDa), TNF-α - Vorform (26 kDa), aktive Form TNF-α (17 kDa), MMP-3 - Vorform (59/57 kDa), aktive Form MMP-3 (28 kDa), TGF-β1,2,3 (12,5 kDa). Der Nachweis von IL-1α (17 kDa) und IL-6 (21 kDa) konnte durch Immunpräzipitation erfolgen.
Mit Hilfe des ELISA gelang der quantitative Nachweis der aktiven Formen von Substanz P (11 kDa), TNF-α (28 kDa), IL-1α (17 kDa) und IL-6 (21 kDa).

3.1. Schmerzanamnese und Blutbild der Patienten

In der Patientengruppe, in der die Operation aufgrund einer chronisch degenerativen Bandscheibenerkrankung durchgeführt wurde, berichteten die Patienten von einer langjährigen Schmerzanamnese (8 ± 1,5 Jahre). In den letzten Monaten vor der Operation fand sich jeweils eine starke Schmerzzunahme (13 ± 7 Monate). Die Quantifizierung des einzelnen Schmerzerlebnisses erfolgte mit Hilfe der "Visual Analogous Scale" (VAS) durch jeden einzelnen Patienten. Dem Schmerz konnten hierbei Werte zwischen 0 (kein Schmerz) bis 10 (maximaler Schmerz) zugeordnet werden. Im Durchschnitt wurde der Wert 7 (± 1) zur Beschreibung der Rückenschmerzen und der Wert 6,3 (± 0,8) für die Beinschmerzen angegeben.
In der Patientengruppe, die aufgrund eines symptomatischen Bandscheibenvorfalls operiert wurde, fand sich im Schnitt eine kürzere Rückenschmerzanamnese von nur einigen Monaten (22 ± 9 Monate). Bei diesen Patienten war es allerdings zu einer akuten Schmerzzunahme innerhalb von nur wenigen Tagen (20 ± 12 Tage) gekommen, wodurch ein operativer Eingriff erforderlich wurde.

Im Blutbild der Patientengruppe mit einer chronisch degenerativen Bandscheibenerkrankung zeigten sich höhere Entzündungsparameter als bei den Patienten mit einem symptomatischen Bandscheibenvorfall. Bei 43 % der Patienten mit einer chronisch degenerativen Bandscheibenerkrankung war das C-reaktive Protein erhöht (7 ± 3,8 mg/l; Referenzbereich: < 5 mg/l). Eine Leukozytose fand sich bei 14 % der Patienten (8,2 ± 0,7 Mrd/l; Referenzbereich: 4,5 - 11,5 Mrd/l). In der Patientengruppe mit

einem symptomatischen Bandscheibenprolaps war das C-reaktive Protein bei nur 13 % der Patienten erhöht (1 ± 0,7 mg/l). Eine Leukozytose fand sich bei keinem der Patienten (8 ± 0,4 Mrd/l).

3.2. Substanz P (SP, PPT-A)

Im Anulus fibrosus der chronisch degenerativen Bandscheiben fand sich eine relative Proteinexpression der Vorform von Substanz P, die verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant um das 1,4-fache erhöht (p=0,024) war (siehe Abb. 6). Im Nucleus pulposus dieser Patientengruppe war die Expression hingegen um den Faktor 0,7 niedriger.
Mit Hilfe des ELISA (siehe Abb. 5) konnte die aktive 11 kDa-Form von Substanz P hingegen im Nucleus pulposus signifikant vermehrt (1,2-fach erhöht, p=0,031) nachgewiesen werden (NP: 271,98 ± 18 pg/mg Protein; NP Kontrolle: 416,98 ± 32 pg/mg Protein). Im Anulus fibrosus war die Proteinexpression im Vergleich mit der Kontrollgruppe unverändert (AF: 394,23 ± 25 pg/mg Protein; AF Kontrolle: 392,67 ± 33 pg/mg Protein).
Sowohl im Nachweis von Substanz P mittels ELISA als auch im Westernblot zeigte sich eine Abnahme der Expression von Substanz P und seiner Vorform im sequestrierten Bandscheibengewebe im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Die Expressionsmenge der aktiven Form war signifikant um den Faktor 0,6 niedriger (p=0,001). Die Expression der latenten Vorform war um den Faktor 0,7 niedriger.
Im Nucleus pulposus chronisch degenerierter Bandscheiben war daher 2,1-fach mehr aktives SP enthalten als im Sequester, während die Vorform in beiden Geweben gleich stark exprimiert war.

Eine signifikante positive Korrelation zeigte sich zwischen der im chronisch degenerierten Anulus fibrosus nachgewiesenen aktiven Substanz P und der Dauer der Schmerzanamnese (p=0,059). Ebenso gab es eine positive signifikante Korrelation zwischen der Expression von SP und der Vorform von SP im chronisch degenerierten Nucleus pulposus und dem BMI der Patienten dieser Gruppe (p=0,027, bzw. p=0,051).

3.3. Tumornekrosefaktor-α (TNF-α)

Verglichen mit den Kontrollen zeigte sich im Anulus fibrosus chronisch degenerierter Bandscheiben ein signifikanter 2,5-facher Anstieg der relativen Expression der aktiven 17 kDa Form von TNF-α (p=0,008) (siehe Abb. 8). Im Nucleus pulpsus hingegen fand sich eine Reduktion der Expression um das 0,9-fache der Kontrollgruppe. Die TNF-α Vorform war hingegen in beiden Bereichen der untersuchten Bandscheiben erhöht, im Anulus fibrosus (4,5-fach; p=0,013) und im Nucleus pulposus (2,2-fach; p=0,023). In den mit Hilfe des ELISA ermittelten Ergebnissen (siehe Abb. 7) zeigte sich ein

1,4-facher Anstieg der aktiven 17 kDa Form sowohl im AF (55,47 ± 7 pg/mg Protein) als auch im NP (56,25 ± 6 pg/mg Protein) verglichen mit den Kontrollgruppen (AF: 38,96 ± 3 pg/mg Protein; NP: 40,0 ± 4 pg/mg Protein). Die Menge des aktiven TNFα im Sequester im Vergleich mit den Kontrollen war bei beiden Messverfahren leicht verringert (28,91 ± 4 pg/mg Protein), so dass sich nach der ELISA-Analyse im NP der chronisch degenerierten Bandscheiben fast doppelt soviel TNF-α nachweisen ließ wie im Sequester (p=0,012). Die relative Expression der 26 kDa TNF-α Vorform war dahingegen, genauso wie im NP chronisch degenerierter Bandscheiben, signifikant erhöht (p=0,041).

Die Ergebnisse zeigten eine positive Korrelation zwischen der Body Mass Index-Zunahme und der Expression von TNF-α im chronisch degenierten Nucleus pulposus (p=0,03) und proTNF-α im Anulus fibrosus (p=0,025). Zwischen der Zunahme von C-reaktivem Protein im Patientenserum und der Expression von proTNF-α im chronisch degenerierten Anulus fibrosus konnte ebenfalls eine positive, signifikante Korrelation nachgewiesen werden (p=0,028).

3.4. Interleukin-1α (IL-1α)

Die nachgewiesene IL-1α Menge war in allen Probegeweben sehr gering. Mittels ELISA zeigte sich im Vergleich mit den Kontrollen (AF: 2,3 ± 0,5 pg/mg Protein; NP: 3,1 ± 0,3 pg/mg Protein) eine Zunahme von IL-1α sowohl im AF (5,0 ± 0,8 pg/mg Protein; p=0,05) als auch im NP (5,1 ± 1,1 pg/mg Protein) chronisch degenerierter Bandscheiben, während es im Sequester zu keiner signifikanten Veränderung kam (2,5 ± 0,3 pg/mg Protein) (siehe Abb. 9). Auch mit Hilfe der Westernblots (siehe Abb. 10) ließ sich im AF eine Zunahme der relativen Proteinexpression von IL-1α nachweisen (1,2-fach). Im NP zeigte sich dahingegen allerdings eine signifikante Abnahme um den Faktor 0,8 (p=0,03). Im Sequester war, wie bei der ELISA-Analyse, keine signifikante Veränderung nachweisbar.

Eine positive signifikante Korrelation konnte zwischen der Zunahme von CRP im Patientenserum und der Expression von IL-1α (p=0,037) im Sequester nachgewiesen werden.

3.5.Interleukin-6 (IL-6)

Während sich mittels ELISA (siehe Abb. 11) im Vergleich mit der Kontrolle (6,1 ± 1,1 pg/mg Protein) eine signifikante Abnahme von IL-6 im AF zeigte (2,5 ± 1,2 pg/mg Protein; p=0,04), stellte sich mittels Westernblot (siehe Abb. 12) eine 1,8-fache Zunahme der relativen Expression von IL-6 im AF dar (p=0,01). Genau entgegengesetzt verhielt es sich mit den Werten im NP chronisch degenerierter Bandscheiben. Die Westernblots zeigten eine signifikante Abnahme um den Faktor 0,8 (p=0,01), der

ELISA eine Zunahme um den Faktor 2 (NP: 3,0 ± 1,2 pg/mg Protein, NP Kontrolle: 1,4 ± 1,0 pg/mg Protein). Eine Zunahme von IL-6 im Sequester ließ sich sowohl mittels ELISA (2-fach, 3,1 ± 1,2 pg/mg Protein) als auch mittels Westernblot darstellen (1,1-fach; p=0,02).

Die Daten zeigen eine signifikante Korrelation zwischen der Dauer der Schmerzanamnese und der Expression von IL-6 im Nucleus pulposus chronisch degenerierter Bandscheiben (p=0,036) sowie im Sequester prolabierter Bandscheiben (p=0,049).

3.6. Matrixmetalloproteinase-3 (MMP-3)

Es zeigte sich sowohl in chronisch degenerierten Bandscheibengewebe als auch in den Sequestern eine Zunahme der MMP-3 Expression im Vergleich mit den Kontrollen (siehe Abb. 13). Die relative Expression der aktiven 28 kDa und der 57/59 kDa Vorform war im degenerierten NP und im Sequester deutlich höher als im AF (28 kDa: AF: 2-fach; NP: 3,3-fach, p=0,025; Seq.: 3,1-fach; p=0,025) (57/59 kDa: AF: 2-fach, p=0,021; NP: 2,2-fach, p=0,034; Seq.: 2,7-fach, p= 0,014).

Auch hier konnte eine positive Korrelation zwischen der Länge der Schmerzanamnese und der Expression von MMP-3 (p=0,068) und proMMP-3 (p=0,004) im chronisch degenerierten Nucleus pulposus nachgewiesen werden. Des weiteren ließ sich im chronisch degenerierten Nucleus eine positive signifikante Korrelation zwischen der Expression von MMP-3 (p=0,022) und dem zunehmenden Alter darstellen.

3.7.Transforming Growth Factor-β1,2,3 (TGF-β1,2,3)

Im Anulus fibrosus chronisch degenerierter Bandscheiben zeigte sich ein signifikanter Anstieg der relativen Expression von TGF-β1,2,3 um den Faktor 2,2 (p=0,028) (siehe Abb. 14). Dahingegen stellten wir eine signifikante Abnahme der Expression sowohl im Nucleus pulposus chronisch degenerierter Bandscheiben (0,6-fach) als auch im Sequester (0,8-fach) fest (jeweils p=0,028).

3.8. Bildanhang - Ergebnisse

3.8.1.1. SP - ELISA

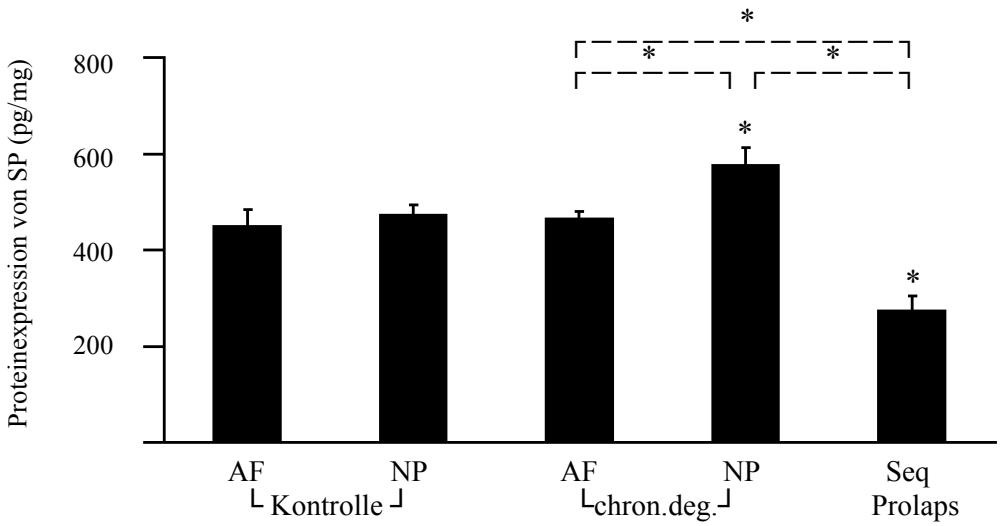


Abb. 5

Abb. 5: Das Diagramm stellt die Proteinexpression (pg/mg) der aktiven Substanz P in den Kontrollbandscheiben (AF, NP), in chronisch degenerierten (AF, NP) und prolabierten Bandscheiben (Seq.) dar (*: $p < 0,05$). Die Werte wurden mittels ELISA erhoben.

3.8.1.2. PPT-A (SP-Vorform) - Westernblot

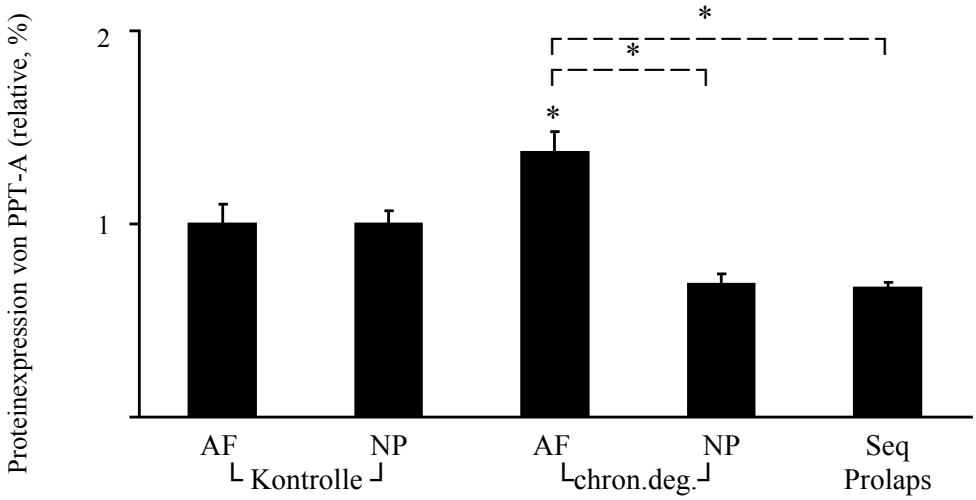


Abb. 6.a

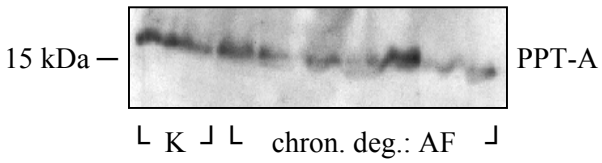


Abb. 6.b

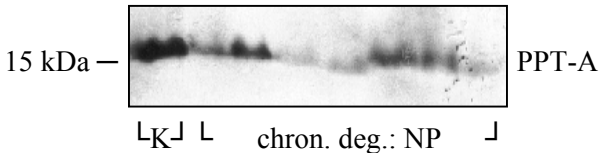


Abb. 6.c

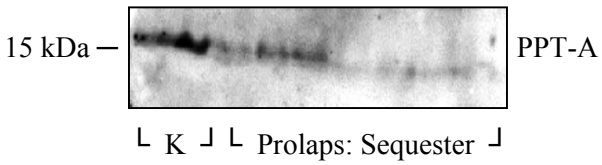


Abb- 6.d

Abb. 6.a: Das Diagramm stellt die relative Proteinexpression (%) der Vorstufe von Substanz P (PPT-A, 15 kDa) in chronisch degenerierten (AF, NP) und prolabierten Bandscheiben (Seq.) im Vergleich zu den Kontrollbandscheiben K (AF bzw. NP) dar (*: $p < 0,05$). Die semiquantitative Messung erfolgte mittels Westernblot:

Abb. 6.b: AF chronisch degenerierter Bandscheiben im Vergleich zu Kontroll-AF (K)

Abb. 6.c: NP chronisch degenerierter Bandscheiben im Vergleich zu Kontroll-NP (K)

Abb. 6.d: Seqester prolabierter Bandscheiben im Vergleich zu Kontroll-NP (K)

3.8.2.1. TNF-α - ELISA

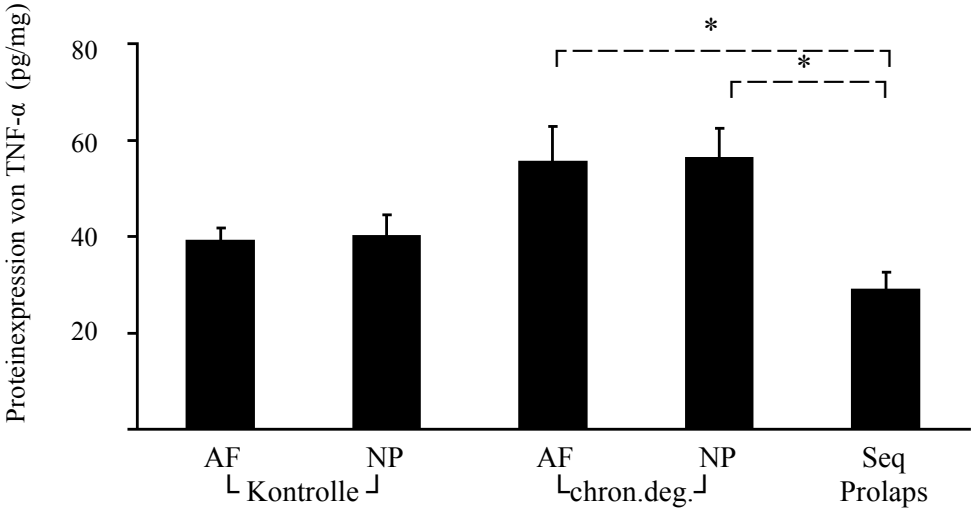


Abb. 7

Abb. 7: Das Diagramm stellt die Proteinexpression (pg/mg) des aktiven TNF-α in den Kontrollbandscheiben (AF, NP), in chronisch degenerierten (AF, NP) und prolabierten Bandscheiben (Seq.) dar (*: $p < 0,05$). Die Werte wurden mittels ELISA erhoben.

3.8.2.2. TNF-α - Westernblot

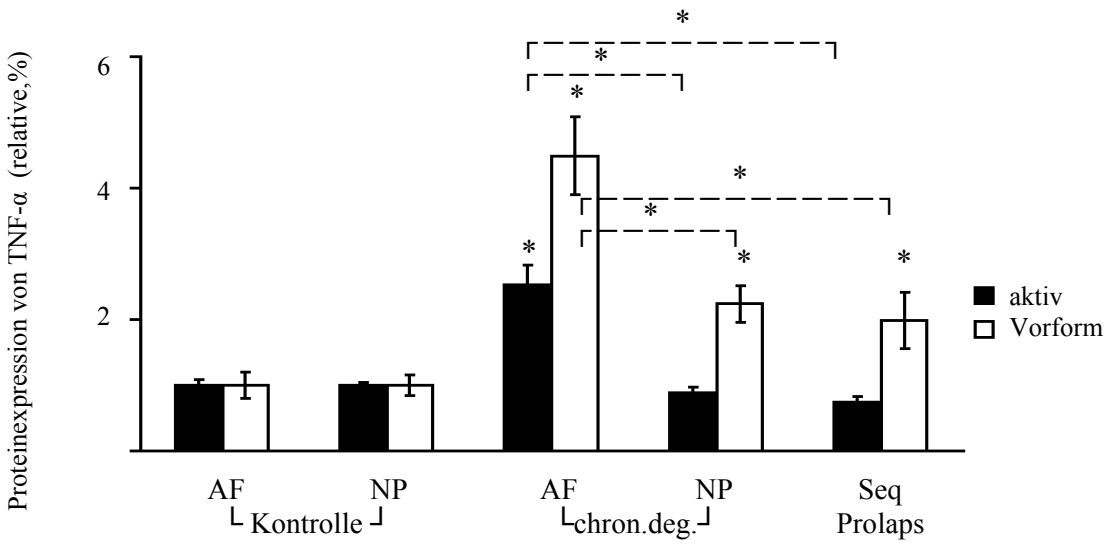


Abb. 8.a

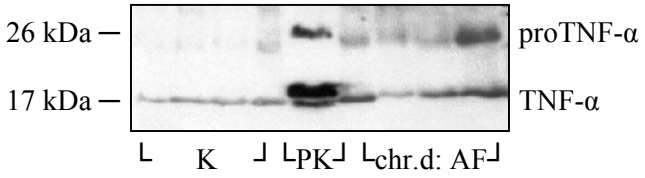


Abb. 8.b

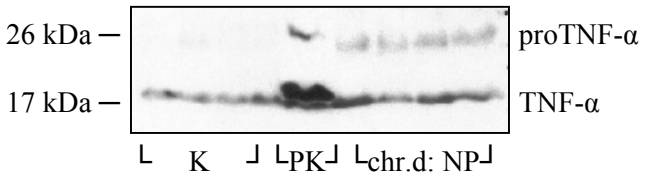


Abb. 8.c

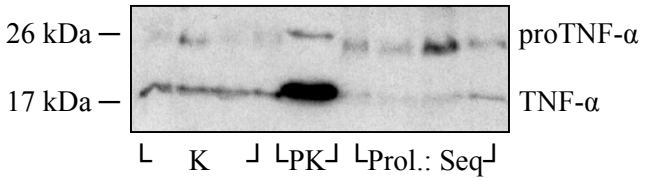


Abb. 8.d

Abb. 8.a: Das Diagramm stellt die relative Proteinexpression (%) der aktiven Form (17 kDa) und der Vorform (26 kDa) von TNF-α in chronisch degenerierten (AF, NP) und prolabierten Bandscheiben (Seq.) im Vergleich zu den Kontrollbandscheiben K (AF bzw. NP) dar (*: $p < 0,05$). Die semiquantitative Messung erfolgte mittels Westernblot (PK = Positivkontrolle):

Abb. 8.b: AF chronisch degenerierter Bandscheiben im Vergleich zu Kontroll-AF (K)

Abb. 8.c: NP chronisch degenerierter Bandscheiben im Vergleich zu Kontroll-NP (K)

Abb. 8.d: Seqester prolabierter Bandscheiben im Vergleich zu Kontroll-NP (K)

3.8.3.1. IL-1α - ELISA

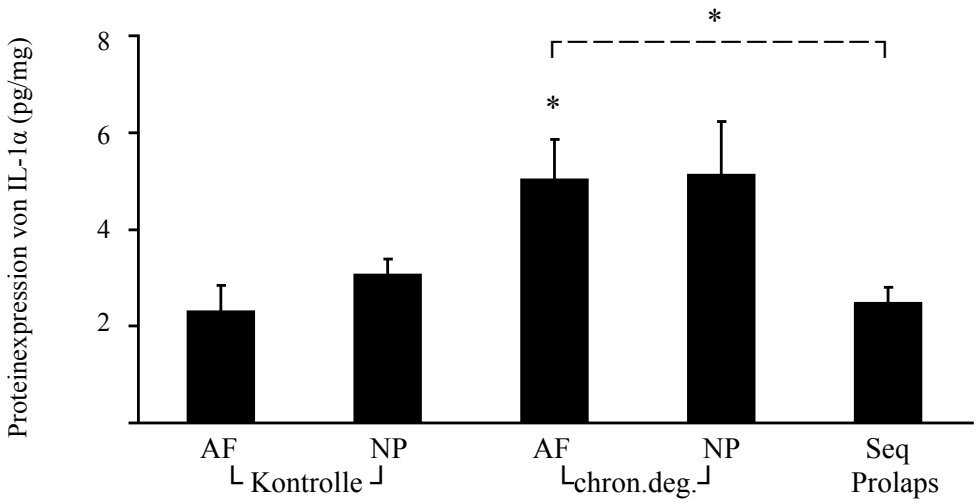


Abb. 9.a

Abb. 9.a: Das Diagramm stellt die Proteinexpression (pg/mg) des aktiven IL-1α in den Kontrollbandscheiben (AF, NP), in chronisch degenerierten (AF, NP) und prolabierten Bandscheiben (Seq.) dar (*: $p < 0,05$). Die Werte wurden mittels ELISA erhoben.

3.8.3.2. IL-1α - Westernblot

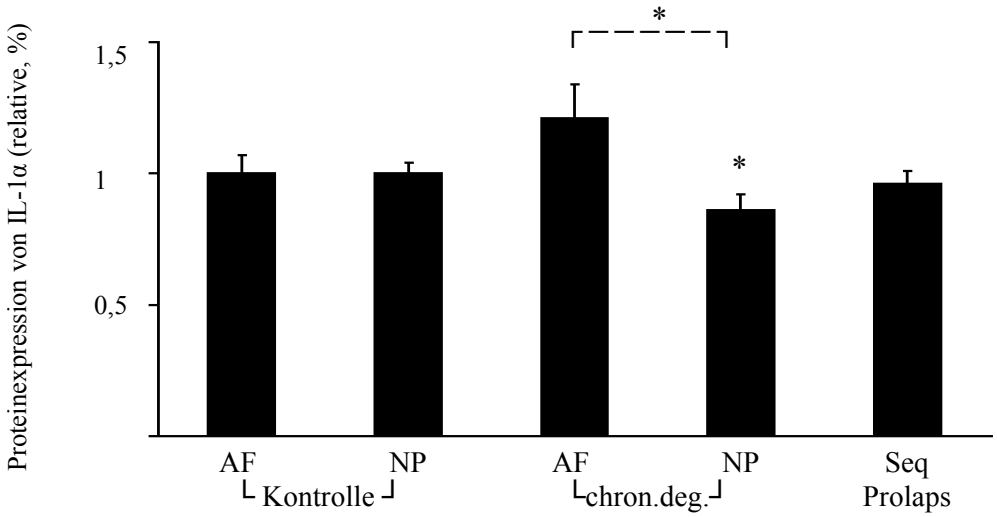


Abb. 10.a

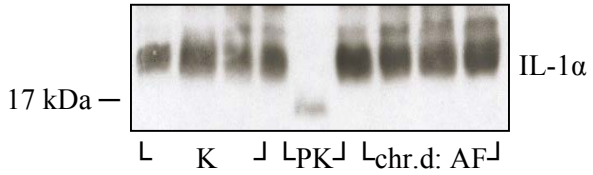


Abb. 10.b

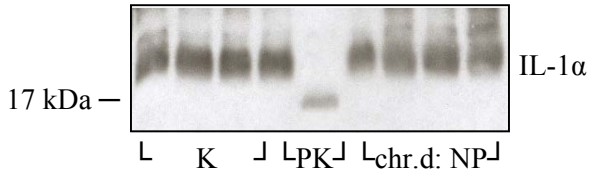


Abb. 10.c

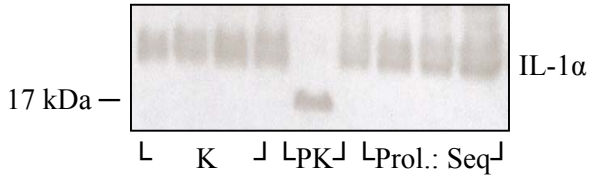


Abb. 10.d

Abb. 10.a: Das Diagramm stellt die relative Proteinexpression (%) des aktiven IL-1α (17 kDa) in chronisch degenerierten (AF, NP) und prolabierten Bandscheiben (Seq.) im Vergleich zu den Kontrollbandscheiben K (AF bzw. NP) dar (*: $p < 0,05$). Die semiquantitative Messung erfolgte mittels Westernblot (PK = Positivkontrolle):

Abb. 10.b: AF chronisch degenerierter Bandscheiben im Vergleich zu Kontroll-AF (K)

Abb. 10.c: NP chronisch degenerierter Bandscheiben im Vergleich zu Kontroll-NP (K)

Abb. 10.d: Seqester prolabierter Bandscheiben im Vergleich zu Kontroll-NP (K)

3.8.4.1. IL-6 - ELISA

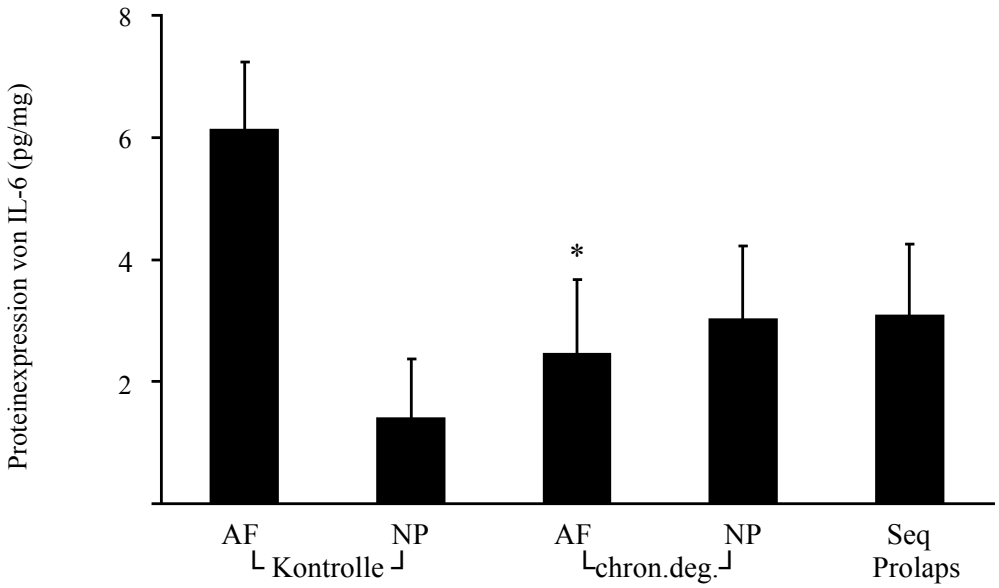


Abb. 11.a

Abb. 11.a: Das Diagramm stellt die Proteinexpression (pg/mg) des aktiven IL-6 in den Kontrollbandscheiben (AF, NP), in chronisch degenerierten (AF, NP) und prolabierten Bandscheiben (Seq.) dar (*: $p < 0,05$). Die Werte wurden mittels ELISA erhoben.

3.8.4.2. IL-6 - Westernblot

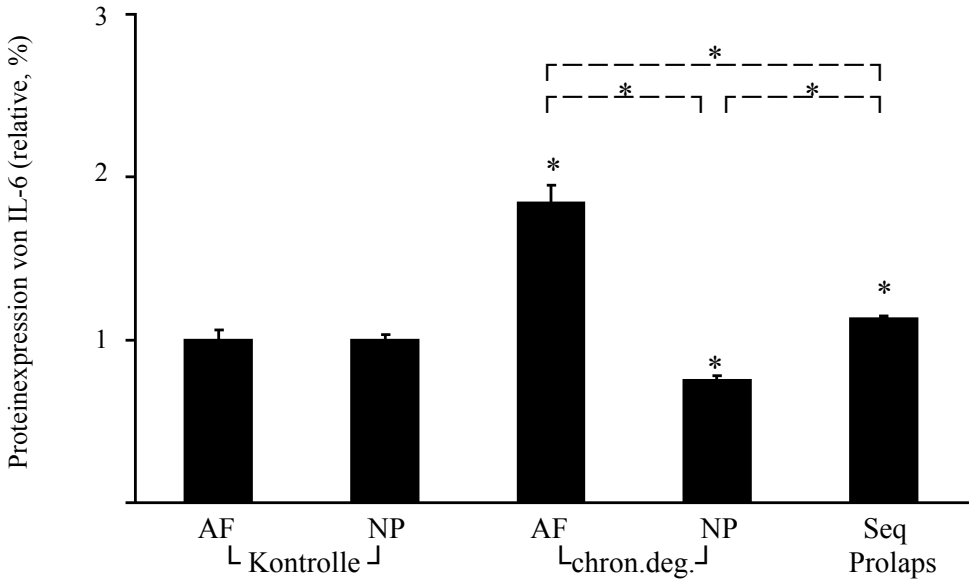


Abb. 12.a

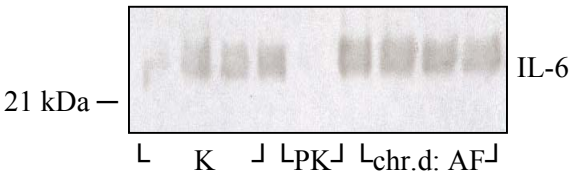


Abb. 12.b

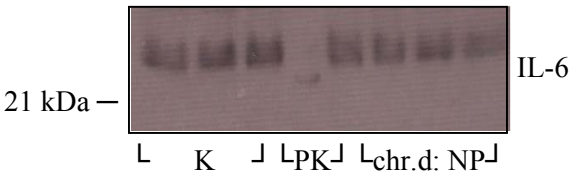


Abb. 12.c

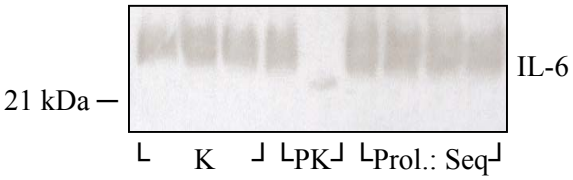


Abb. 12.d

Abb. 12.a: Das Diagramm stellt die relative Proteinexpression (%) des aktiven IL-6 (21 kDa) in chronisch degenerierten (AF, NP) und prolabierten Bandscheiben (Seq.) im Vergleich zu den Kontrollbandscheiben K (AF bzw. NP) dar (*: $p < 0,05$). Die semiquantitative Messung erfolgte mittels Westernblot (PK = Positivkontrolle):

Abb. 12.b: AF chronisch degenerierter Bandscheiben im Vergleich zu Kontroll-AF (K)

Abb. 12.c: NP chronisch degenerierter Bandscheiben im Vergleich zu Kontroll-NP (K)

Abb. 12.d: Seqester prolabierter Bandscheiben im Vergleich zu Kontroll-NP (K)

3.8.5. MMP-3 - Westernblot

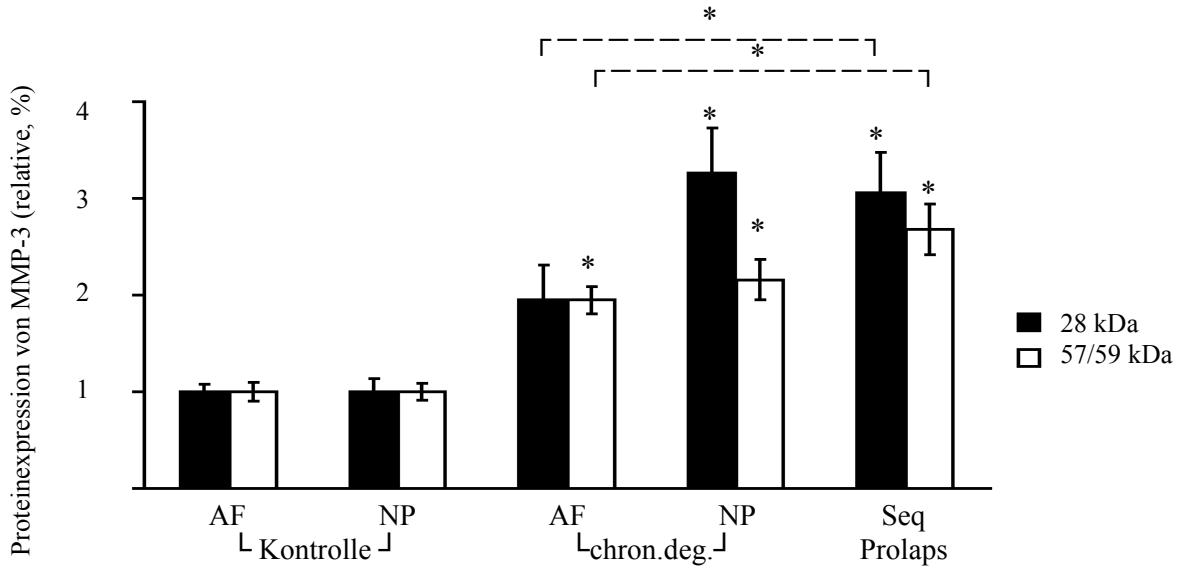
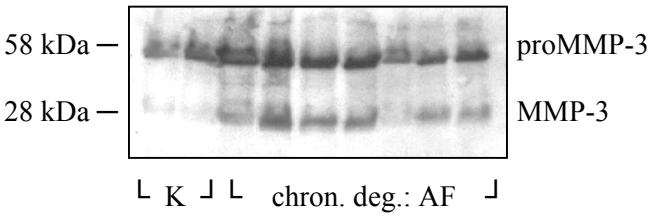


Abb. 13.a



Abb, 13.b

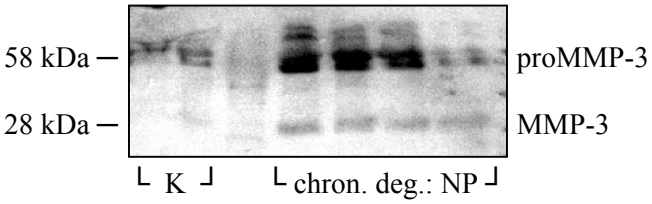


Abb. 13.c

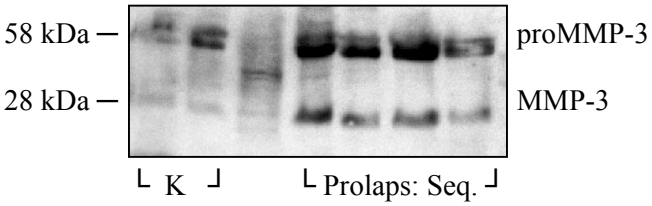


Abb. 13.d

Abb. 13.a: Das Diagramm stellt die relative Proteinexpression (%) der aktiven Form (28 kDa) und der Vorform (57/59 kDa) von MMP-3 in chronisch degenerierten (AF, NP) und prolabierten Bandscheiben (Seq.) im Vergleich zu den Kontrollbandscheiben K (AF bzw. NP) dar (*: $p < 0,05$). Die semiquantitative Messung erfolgte mittels Westernblot:

Abb. 13.b: AF chronisch degenerierter Bandscheiben im Vergleich zu Kontroll-AF (K)

Abb. 13.c: NP chronisch degenerierter Bandscheiben im Vergleich zu Kontroll-NP (K)

Abb. 13.d: Seqester prolabierter Bandscheiben im Vergleich zu Kontroll-NP (K)

3.8.6. TGF-β - Westernblot

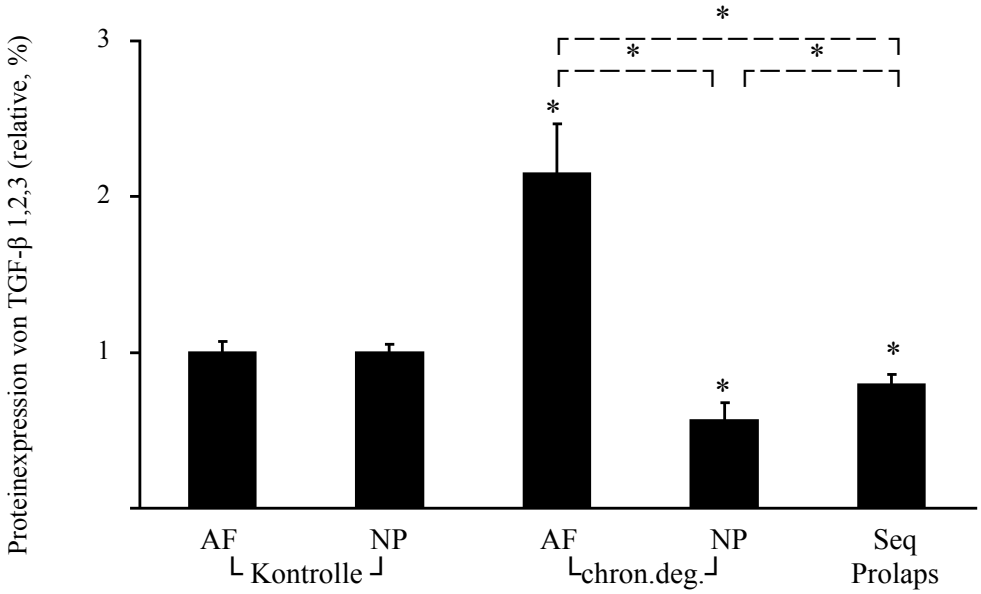


Abb. 14.a

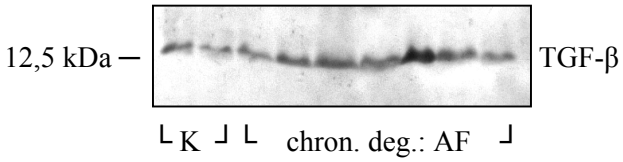


Abb. 14.b

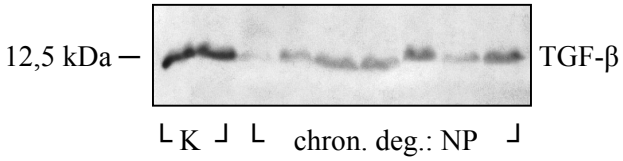


Abb. 14.c

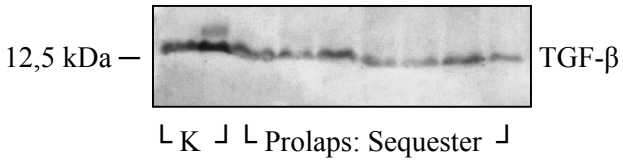


Abb. 14.d

Abb. 14.a: Das Diagramm stellt die relative Proteinexpression (%) von TGF-β (12,5 kDa) in chronisch degenerierten (AF, NP) und prolabierten Bandscheiben (Seq.) im Vergleich zu den Kontrollbandscheiben K (AF bzw. NP) dar (*: $p < 0,05$). Die semiquantitative Messung erfolgte mittels Westernblot:

Abb. 14.b: AF chronisch degenerierter Bandscheiben im Vergleich zu Kontroll-AF (K)

Abb. 14.c. NP chronisch degenerierter Bandscheiben im Vergleich zu Kontroll-NP (K)

Abb. 14.d: Seqester prolabierter Bandscheiben im Vergleich zu Kontroll-NP (K)

4. DISKUSSION

Die pathogenetischen Ursachen der algogenen Bandscheibendegeneration sind bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Sowohl mechanische als auch biochemische Mechanismen scheinen an der Entstehung chronischer Rückenschmerzen beteiligt zu sein [3]. Zytokine als Mediatoren auf zellulärer Ebene, wie z. B. die Substanz P, TNF-α und IL-1α, die bei der Schmerzübermittlung involviert sind [46] [18], konnten im Bandscheibengewebe nachgewiesen werden [82] [48]. Auch die Matrix-Metalloproteinase MMP-3 sowie das Zytokin TGF-β konnten im Zusammenhang mit der algogenen Bandscheibendegeneration als bedeutende Protease bzw. als Wachstumsfaktor identifiziert werden [9] [5] [83]. Die Rolle dieser Zytokine und ihre spezifischen Expressionsprofile im Rahmen der Bandscheibendegeneration wurden in bisherigen Studien noch nicht vollständig differenziert dargestellt.
Das Ziel dieser Studie war die differenzierte Untersuchung der Expressionsmuster der obigen Proteine im Anulus und Nucleus von chronisch und akut degenerierten Bandscheibengewebe, um aus diesen Erkenntnissen möglicherweise neue und individuell angepasste Konzepte zur Behandlung und Schmerztherapie zu erlangen.

In der vorliegenden Studie ließen sich jeweils signifikant höhere Mengen proinflammatorischer Zytokine in Bandscheiben von Patienten mit chronisch degeneriertem Bandscheibenleiden nachweisen als in prolabiertem Bandscheibengewebe oder in der Kontrollgruppe. Der Gehalt der proinflammatorischen Zytokine im Anulus der Bandscheibe war hierbei jeweils höher als im Nucleus.
Auch die Substanz P war in chronisch degenerierten Bandscheiben signifikant erhöht zu finden. Hierdurch konnte die These der Arbeitsgruppe um Afrah bestätigt werden, die der Substanz P eine entscheidende Rolle bei der Chronifizierung der Schmerzentstehung zuschreibt [84] [85].

4.1. Substanz P

Die Substanz P ist sowohl bei der Entstehung chronischer Schmerzen [84] als auch bei der Bildung neurogener Entzündungen involviert [62]. Die ansteigende Expression der Substanz P in chronisch degenerierten Bandscheiben unterstützt somit die Annahme, SP spiele eine entscheidende Rolle bei der schmerzhaften chronischen Bandscheibendegeneration [18].
Die im Anulus fibrosus nachgewiesene vermehrte Expression der SP-Vorstufe und die positive Korrelation zwischen der Länge der Schmerzanamnese und des Substanz P-Gehaltes (je länger die Schmerzen bestehen, desto höher ist die an SP nachgewiesene Menge) könnten Ausdruck einer vermehrten Bildung SP-sezernierender afferenter Nervenfasern in diesem Gewebe sein [85]. Bei der gesunden Bandscheibe begrenzt sich die Einsprossung der dünnen Nervenendigungen auf die äußeren

Anulus fibrosus Schichten. Freemont *et al*. [48] konnten ein Einwachsen der afferenten SP-sezernierenden Nervenendigungen bis in den Nucleus degenerierter Bandscheiben nachweisen. Die in der vorliegenden Studie nachgewiesene vermehrte Expression der aktiven Substanz P im Nucleus bei denjenigen Patienten, die an einer chronischen Bandscheibenerkrankung leiden, unterstützt diese Beobachtung. Im Anulus chronisch degenerierter Bandscheiben ließ sich hingegen kein Anstieg der Expression der aktiven Substanz P nachweisen. Ein Grund hierfür könnte die Spaltung der aktiven 11 kDa großen Substanz P in die biologisch-aktiven Fragmente, wie z.B. das Fragment SP 7-11, sein [62]. Dies könnte im Rahmen eines erhöhten Umsatzes vorkommen. Obwohl freie Nervenendigungen an der Oberfläche prolabierter Bandscheiben in vorherigen Studien nachgewiesen werden konnten [53], zeigte sich in den Bandscheibensequestern eine geringere Menge an SP und seiner Vorstufe als in den Kontrollbandscheiben. Dies ließe sich zum Beispiel durch das fehlende Einsprossen der Nervenendigungen aufgrund des akuten Ereignisses bei der Sequestrierung erklären. Zu beachten ist außerdem, dass Sequester in der Regel aus Nucleus-Gewebe bestehen, während es sich bei prolabierten Bandscheiben um hervorgewölbtes Anulus-Gewebe handelt. Eine weitere Rolle könnte die erhöhte Diffusionsfähigkeit des freigesetzten Sequesters spielen, die ebenfalls zu einer Verminderung des SP-Anteils im Vergleich zu dem jeweiligen Anteil in den Kontrollbandscheiben führen.

4.2. TNF-α, IL-1α, IL-6

In früheren *in vitro* Studien konnte bereits die Anwesenheit proinflammatorischer Zytokine, wie zum Beispiel TNF-α, IL-6, IL-8 und IL-1β, in Kulturen degenerierter Bandscheiben nachgewiesen werden [86]. Tierversuche zeigten durch die lokale, epidurale Applikation von Nucleus-Gewebe sowohl strukturelle als auch funktionelle Änderungen der angrenzenden Nervenwurzeln. Das im Nucleus nachgewiesene Zytokin TNF-α schien hierbei eine entscheidende Rolle zu spielen [45]. Die Beteiligung der proinflammatorischen Zytokine sowohl an den degenerativen Prozessen als auch an der Nervenentzündung und Schmerzentstehung konnte ebenfalls nachgewiesen werden [46]. Die bei der vorliegenden Studie *in vivo* nachgewiesene Zunahme von TNF-α im Anulus und Nucleus chronisch degenerierter Bandscheiben stimmt mit den Ergebnissen der *in vitro* Studie von Burke *et al*. [86] überein und unterstützt die These, dass TNF-α eine entscheidende Rolle bei der Entstehung neurogener Schmerzen spielt [47]. Die im Rahmen des Degenerationsvorganges auftretende Bildung und Einsprossung neuer Blutgefäße in die Bandscheibe sind hierbei wichtig für die Bereitstellung aktivierter Makrophagen, die die proinflammatorischen Zytokine freisetzen. Hierzu passend zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der Dauer der bestehenden Schmerzen und den detektierten IL-6-Spiegeln in chronisch degenerierten Nuclei und Sequestern. Die im Gegensatz zum Nucleus stark erhöhte Expression der TNF-α Vorform im Anulus könnte durch das dichtere Gefäßnetz im Anulus erklärt werden. Während die Vorform im Faserringgewebe bleibt, kann die aktive Form bis

in den Nucleus diffundieren [47]. Die Substanz P kann die Zytokin-Freisetzung aus den Makrophagen erhöhen [17]. Der niedrige SP-Gehalt im Sequester und das aufgrund des akuten Ereignisses fehlende neue Nerven- und Gefäßnetz könnte daher für den niedrigen Gehalt an proinflammatorischen Zytokinen im Sequester verantwortlich sein. Des weiteren ist zu beachten, dass es bei dem herausgetrennten Bandscheibengewebe außerdem zu einer verstärkten Diffusion der Proteine in die Umgebung kommen könnte.

Botenstoffe des Immunsystems wie die Zytokine TNF-α und IL-1 sorgen für eine erhöhte Produktion der Akute-Phase-Proteine, zu denen unter anderem das C-reaktive Protein (CRP) gehört. Passend hierzu fand sich eine signifikante Korrelation zwischen der Expression der TNF-α-Vorform im chronisch degenerierten Anulus fibrosus und des IL-1α im Sequester und dem CRP-Level im Patientenserum.

Die ermittelten Daten wiesen außerdem eine signifikante, positive Korrelation zwischen dem BMI der Patienten und der mit Hilfe von Westernblots nachgewiesenen TNF-α Expression (TNF-α und proTNF-α) in den chronisch degenerierten Bandscheiben nach. Bereits in früheren Studien wurde beschrieben, dass TNF-α von adipösem Gewebe und Adipozyten sezerniert wird und an der Entstehung einer Insulinresistenz beteiligt zu sein scheint. In diesen Studien wurde jeweils ein deutlicher Abfall der TNF-α Konzentration im Serum bei Gewichtsreduktion nachgewiesen [87].

4.3. MMP-3, TGF-β

Es zeigte sich eine höhere Expression von MMP-3 im chronisch degenerierten Nucleus und im Sequester als im Anulus. Im Anulus fand sich dahingegen eine hierzu entsprechende signifikant erhöhte Expression von TGF-β, welches eine Hemmung von MMP-3 bewirkt.

Im Rahmen der Bandscheibendegeneration sind vor allem MMP-3 als Protease und TGFβ als Wachstumsfaktor am Gewebeauf- und -abbau beteiligt. In der vorliegenden Studie zeigte sich, ähnlich wie in vorherigen Studien, ein starker Anstieg der TGF-β Expression im Anulus fibrosus chronisch degenerierter Bandscheiben, während die Expression im Nucleus und im Sequester geringer war als in den Kontrollbandscheiben. Melrose *et. al*. [88] wies eine deutliche Abhängigkeit der zunehmenden TGF-β Expression vom Ausmaß des einwachsenden Gefäßnetzes in die degenerierte Bandscheibe nach. Die nur im Anulus fibrosus nachgewiesene starke Zunahme der TGF-β Expression passt daher zu der Tatsache, dass sich die Gefäße fast ausschließlich im Anulus fibrosus befinden.

Die MMP-3 Synthese wird unter anderem durch TGF-β supprimiert. Zum einen stimuliert TGF-β die Synthese des natürlichen MMP-3-Hemmers TIMP (Tissue inhibitor of metalloproteinase), zum anderen hemmt es die Umformung von der latenten in die aktive Proteaseform [9] [89]. Hierzu passen die Ergebnisse der vorliegenden Studie: Die Expression von MMP-3 ist im TGF-β-armen Gewebe,

dem Nucleus pulposus chronisch degenerierter Bandscheiben und dem Sequester, deutlich höher als im TGF-β-reichen Gewebe, dem Anulus fibrosus. Auch der im Vergleich zum Nucleus chronisch degenerierter Bandscheiben höhere Anteil der latenten Vorform proMMP-3 im Sequester lässt sich durch den höheren TGF-β Anteil im Sequester erklären.
Durch das Fehlen bzw. die niedrige Expression von anabolen Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel TGF-β, ist der Nucleus besonders verwundbar und degenerationsgefährdet [23]. Hinzu kommt, dass der Nucleus im Gegensatz zum Anulus einen viel geringeren Anteil an Kollagenfasern besitzt, so dass jeglicher Kollagenverlust zu signifikanten mechanischen Veränderungen führt [90].
Schließlich zeigte sich eine positive signifikante Korrelation sowohl zwischen dem Alter des Patienten und der MMP-3-Expression im chronisch degenerierten Nucleus, als auch zwischen der Dauer der bestehenden Schmerzen und der MMP-3-Expression in diesem Gewebe. Dies unterstützt die These, dass diese Metalloproteinase an den degenerativen Prozessen beteiligt ist, wie auch an dem physiologisch stattfindenden degenerativen Umbau bei zunehmendem Alter.

4.4. Bedeutung hinsichtlich therapeutischer Maßnahmen

Bei den bisherigen Therapien der Rückenschmerzen, die durch die Degeneration von Bandscheiben verursacht wurden, geht es vor allem um die Minderung oder Ausschaltung der Schmerzen und die Behandlung bzw. Prävention möglicherweise entstandener neurologischer Defizite. Zu den üblichen konservativen Therapien gehört zum Beispiel die Bettruhe mit Stufenlagerung, Physiotherapie und die medikamentöse Therapie mit Analgetika und Antiphlogisika. Nukleotomie, Dissektomie und Spondylodesen gehören zu den häufigen invasiven Maßnahmen.

Bisher nur unzureichende gezielte medikamentöse Therapieansätze umfassen

- die Verhinderung der Schmerzchronifizierung
- das Aufhalten der degenerativen Prozesse bzw. die Unterstützung der Regeneration und Prophylaxe

Die Daten der vorliegenden Studie unterstützen die Annahme, dass die Substanz P an der Schmerzchronifizierung chronisch degenerativer Bandscheibenerkrankungen beteiligt ist. Hieraus ergibt sich ein möglicher neuer therapeutischer Ansatzpunkt zur Verhinderung oder zumindest zur Verminderung der chronischen Schmerzentstehung. Ziel wäre somit die Reduzierung der SP-Wirkung, die auf verschiedenen Wegen erreicht werden könnte: zum Beispiel durch die direkte Blockade von Substanz P, respektive seiner Vorform und die Hemmung der Spaltung in aktive Formen, alternativ durch die Blockade seiner Rezeptoren. Da die Substanz P von den freien Nervenendigungen in der Bandscheibe

sezerniert wird, wäre die Hemmung der Nerveneinsprossung ebenfalls ein möglicher therapeutischer Ansatzpunkt.

Eine erhöhte Präsenz proinflammatorischer Zytokine, wie z. B. TNF-α und IL-1α konnte im Bandscheibengewebe algogener, chronisch degenerierter Bandscheiben nachgewiesen werden. Da diese Zytokine an den Nervenentzündungen, der Entstehung von Schmerzen und an degenerativen Veränderungen beteiligt sind, scheint eine antiphlogistische Therapie sinnvoll zu sein. Dies könnte zum Beispiel durch die Hemmung der proinflammatorischen Zytokine selbst, deren Vorformen oder deren Rezeptoren erfolgen. Takahashi *et al.* [4] zeigte *in vitro* eine Abnahme der Zytokin- und PGE2-Sekretion in menschlichem prolabierten Bandscheibenmaterial nach der Zugabe von Betamathasone, einem Glukokortikoid. Die von Olmarker [91] beobachteten Effekte an einer Nervenwurzel nach der lokalen Applikation von Nucleus-Gewebe konnten durch die Gabe von Methylprednisolon und Cyclosporin A gehemmt werden. Nur zu einer geringen Änderung kam es bei Indomethacin und Lidocain.
Da eine Abhängigkeit der Proteinsekretion von dem in die degenerativ veränderte Bandscheibe einsprießenden Gefäßnetz zu bestehen scheint [92], könnte demnach eine Hemmung der Gefäßbildung begünstigend wirken.
In den Bandscheibensequestern konnte keine erhöhte Expression der oben genannten proinflammatorischen Zytokine festgestellt werden. Trotz fehlender erhöhter proinflammatorischer Zytokinlevel im Sequester ist eine Therapie mit NSAR unter Berücksichtigung der guten langjährigen klinischen Erfahrungen und der therapeutischen Ansatzpunkte außerhalb des Bandscheibengewebes sinnvoll.

Die Ergebnisse hinsichtlich der Expression von MMP-3 und TGF-β bestätigen ebenfalls die Ergebnisse vorherige Studien. Während MMP-3 an degenerativen Prozessen beteiligt ist, hat TGF-β eine anabole Wirkung auf die Bandscheibenmatrix. Um die Bandscheibe vor degenerativen Veränderungen zu schützen, sollte daher versucht werden, die Synthese von MMP-3 zu hemmen und diejenige von TGF-β zu stimulieren. Es gibt zwei Wege die MMP-Level zu reduzieren: durch die Hemmung der Enzymaktivität oder durch die Hemmung der Enzymsynthese. Die Synthese von MMP wird unter anderem durch IL-1 induziert. Der Einsatz von IL-1 Rezeptoranatgonisten IL-1Ra blockiert daher indirekt auch die MMP-Synthese [93]. Zu den natürlichen Hemmstoffen gehören α2-Makroglobuline und TIMP. Die exogene Zufuhr von TIMP führte jedoch in Tierversuchen nur zu einem teilweisen Erfolg, so dass diese Art der Therapie umstritten ist [94]. Alternativ könnte man versuchen, die lokale TIMP-Synthese zu fördern, z. B. durch synthetische Vitamin-A-Analoga oder verschiedenste Zytokine wie TGF-β oder IL-6, die einen positiven Effekt auf die TIMP-Synthese haben. In Tierversuchen wurden *in vitro* bereits spezifische Hemmer von MMPs getestet, die eine Chelatgruppe besitzen, welche direkt an das Zink-Molekül bindet und somit die MMPs blockieren [95]. Die direkte Enzymhemmung gestaltet sich jedoch schwierig, da letztendlich eine Reihe von Enzymen am degenerativen Umbau der Bandscheibe beteiligt sind und somit verschiedenste Inhibitoren benötigt werden würden.

Thompson *et al.* [96] regte an, TGF-β im Rahmen degenerativer Bandscheibenerkrankungen therapeutisch einzusetzen. Da direkt injiziertes TGF-β jedoch nur eine sehr kurze Halbwertszeit hat, gerade aber bei chronisch degenerierten Bandscheiben eine kontinuierliche TGF-β -Sekretion nötig wäre, entstand die Idee der Gentherapie. In vorherigen Studien wurde bereits an Kaninchen-Bandscheiben eine Gentherapie mit Adenoviren getestet, die die lokale TGF-β -Sekretion steigern. Ein signifikanter Anstieg der Proteoglykane konnte in dem Gewebe nachgewiesen werden [83]. Es wäre daher zu überlegen, ob eine Gentherapie auch beim Menschen zum Erfolg führen könnte.
Hinsichtlich der Schmerzchronifizierung bei chronisch degenerativen Bandscheibenerkrankungen sollte nicht übersehen werden, dass generell bei der Chronifizierung von Schmerzen auch die zentrale Sensibilisierung eine bedeutende Rolle spielt [97]. Da eine Analgesie bereits entstandener chronischer Schmerzen auf Dauer schwierig ist, sollte versucht werden, durch rechtzeitige Schmerzbekämpfung, zum Beispiel mit Opioiden oder NSAR, der Bahnung zentraler Schmerzwahrnehmung vorzubeugen.
Zur Prophylaxe der Chronifizierung der Schmerzen ergeben sich durch die Nutzung der Gentherapie möglicherweise ebenfalls neue therapeutische Ansätze. Zu erreichen wäre dies möglicherweise durch die Anwendung von Ergebnissen aus Tiermodellen, in denen die kontinuierliche TGF-β -Synthese gefördert, respektive die MMP-3 -Synthese gehemmt wird.

Da jedoch die Gewinnung von Bandscheibengewebe in der klinisch etablierten Behandlungsroutine aufgrund der Zerstörung der mechanischen Integrität der Bandscheibe naturgemäß nicht sinnvoll erscheint, wäre das Erlangen objektiver Parameter zur Bandscheibendiagnostik durch eine weniger invasive Methode vorzuziehen. Hierbei könnten neben funktionellen bildgebenden Verfahren auch Analysen des metabolischen Umfeldes von Nutzen sein.
Da der operativen Gewinnung von humanem Bandscheibengewebe zu Studienzwecken enge Grenzen gesetzt sind, müssen wie auch bei der hier vorliegende Studie, definierte Einschränkungen in der Auswahl der Patientenkollektive akzeptiert werden. In der Kontrollgruppe findet sich ein durchschnittlich deutlich jüngeres (um ca. 20 Jahre) Patientenkollektiv als in der jeweiligen Untersuchungsgruppe (42 bzw. 51 Jahre). Somit ist in der Kontrollgruppe die physiologische Degeneration aufgrund des geringeren Alters in der Regel noch nicht so weit fortgeschritten wie bei den älteren Patienten. Des weiteren ist das Bandscheibengewebe der Kontrollgruppen aufgrund des aufgetretenen Erkrankungsmusters zum größten Teil aus dem thorakalen Bereich gewonnen worden, während die Sequester und das Probenmaterial der an chronischen Rückenschmerzen leidenden Patienten ausschließlich aus dem lumbalen Bereich stammen. Da die Wirbelsäule in den verschiedenen Abschnitten unterschiedlich belastet wird, spielt dies möglicherweise eine Rolle im Rahmen der physiologischen Degeneration. Wahrscheinlich führt auch die durch die Skoliose bedingte Fehlhaltung partiell zur Mehrbelastung und somit partiell zu einer stärkeren Degeneration der Bandscheibe. In früheren Studien wurden auch Unterschiede zwischen dem inneren und äußeren Anteil des Anulus fibrosus beschrieben [98]. Bei der von uns durchgeführten Studie wurde

hinsichtlich der Lokalisation jedoch nicht unterschieden. Da unsere Proben allein durch kurative Interventionen gewonnen wurden, setzt sich das Patientenkollektiv aus einer heterogenen Gruppe zusammen. Eine homogene Unterteilung von Patientenkollektiven zur Gewinnung humanen Bandscheibngewebes ist im Gegensatz zu Tierexperimenten kaum möglich. Ergebnisse vorhergehender Studien ließen sich jedoch in vielen Fällen in der vorliegenden Studie bestätigen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Degenerative Erkrankungen der Wirbelsäule sind eine Volkskrankheit und gehören neben den Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems zu den wichtigsten und häufigsten Krankheiten weltweit [1]. Die Pathogenese der algogenen Bandscheibendegeneration ist bisher noch nicht vollständig geklärt. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass hierbei sehr komplexe mechanische und proteinbiochemische Mechanismen involviert sind [3]. Ziel dieser Untersuchung war die Studie der Expression definierter Proteine, denen bei der algogenen Bandscheibendegeneration eine besondere Funktion zugeschrieben wird.

Im Rahmen von orthopädischen Eingriffen im Bereich der Bandscheibe konnte humanes Bandscheibengewebe gewonnen werden. Nach der mechanischen Homogenisation und Aufarbeitung des Gewebes konnte mit Hilfe von Westernblot und ELISA-Untersuchungen die Expression von Substanz P, TNF-α, IL-1α, IL-6, TGF-β und MMP-3 semiquantitativ und quantitativ bestimmt werden. Der Vergleich der Expression der oben genannten Proteine bei Patienten mit chronisch degenerativer Bandscheibenerkrankung mit derjenigen bei Patienten mit einem akuten operationspflichtigen Prolaps mit Sequesterbildung ergab in den einzelnen miteinander verglichenen anatomischen Fragmenten der Bandscheiben folgendes komplexes Verteilungsmuster:

- Die Substanz P ist nur in chronisch degenerierten Bandscheiben signifikant erhöht nachweisbar (die Vorform in AF, die aktive Form im NP).
- Die proinflammatorischen Zytokine TNF-α und IL-1α sind ebenfalls nur in chronisch degenerierten Bandscheiben erhöht nachweisbar.
- Während die relative Expression von MMP-3 im chronisch degenerierten NP und im Sequester höher ist als im AF, findet sich eine signifikant erhöhte Expression von TGF-β nur im AF.
- Die Ergebnisse hinsichtlich der IL-6 Expression sind in den beiden Messverfahren unterschiedlich (im Westernblot zeigt sich ein signifikanter Anstieg im AF und ein signifikanter Abfall im NP, während die ELISA-Analyse einen signifikanten Abfall im AF und einen Anstieg im NP zeigt).

Die Hauptbefunde dieser Arbeit lassen sich nun wie folgt zusammenfassen:

1. Durch die ansteigende Expression der Substanz P und weiterer proinflammatorischer Zytokine allein in chronisch degenerierten Bandscheiben wird die Annahme, dass diese eine entscheidende Rolle bei der schmerzhaften chronischen Bandscheibendegeneration spielen, unterstützt. Eine selektive medikamentöse Reduktion der SP-Wirkung bzw. eine antiphlogistische Therapie könnte hier möglicherweise neue therapeutische Angriffspunkte ergeben.

2. Die deutlich niedrigere Expression von MMP-3 in TGF-β-reichem Gewebe (AF chronisch degenerierter Bandscheiben) im Vergleich zur Expression in TGF-β-armen Gewebe (NP, Sequester) unterstützt die These, dass die MMP-3 Synthese unter anderem durch TGF-β supprimiert wird. Zum Schutz der Bandscheibe vor degenerativen Veränderungen besteht hier ein möglicher Ansatzpunkt in der Hemmung der Synthese von MMP-3 bzw. der Stimulation der TGF-β Synthese.

3. Der Anstieg der TGF-β Expression allein im Anulus fibrosus der Bandscheibe lässt eine Abhängigkeit der Expression von den in den Anulus fibrorus degenerierter Bandscheiben einsprießenden Gefäßen vermuten.

4. In zukünftigen Studien sollten neben der Untersuchung von intraoperativ erhaltenem Untersuchungsmaterial weitere Untersuchungsmethoden der Expressionsmuster der an der Schmerzentstehung und Degeneration beteiligten Proteine etabliert werden. Im Rahmen dieser Studien sollte dann eine Überprüfung der möglichen Therapieansätze und Validität der getroffenen Aussagen unter Berücksichtigung aller bisher bekannten an der degenerativen Erkrankung der Bandscheibe beteiligten Faktoren erfolgen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Brux, D., Zur Epidemiologie bandscheibenbedingter Erkrankungen in der Praxis. 1994: Bochum.
2. Krämer, J., Bandscheibenbedingte Erkrankungen. 1997: Thieme Verlag, Stuttgart.
3. Kang, J.D., et al., Toward a biochemical understanding of human intervertebral disc degeneration and herniation. Contributions of nitric oxide, interleukins, prostaglandin E2, and matrix metalloproteinases. Spine, 1997. **22**(10): p. 1065-73.
4. Takahashi, H., et al., Inflammatory cytokines in the herniated disc of the lumbar spine. Spine, 1996. **21**(2): p. 218-24.
5. Ahn, S.H., et al., mRNA expression of cytokines and chemokines in herniated lumbar intervertebral discs. Spine, 2002. **27**(9): p. 911-7.
6. Kang, J.D., et al., Herniated lumbar intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin-6, and prostaglandin E2. Spine, 1996. **21**(3): p. 271-7.
7. Benninghoff, A., Lehrbuch der Anatomie des Menschen. 15 ed. 1994: Urban & Schwarzenberg, München.
8. Junghans, H., Die funktionelle Pathologie der Zwischenwirbelscheiben. Langenbecks Arch. kl. Chir., 1951. **267**(393).
9. Goupille, P., et al., Matrix metalloproteinases: the clue to intervertebral disc degeneration? Spine, 1998. **23**(14): p. 1612-26.
10. Haro, H., et al., Matrix metalloproteinase-3-dependent generation of a macrophage chemoattractant in a model of herniated disc resorption. J Clin Invest, 2000. **105**(2): p. 133-41.
11. Humzah, M.D. and R.W. Soames, Human intervertebral disc: structure and function. Anat Rec, 1988. **220**(4): p. 337-56.
12. Roberts, S., J. Menage, and J.P. Urban, Biochemical and structural properties of the cartilage end-plate and its relation to the intervertebral disc. Spine, 1989. **14**(2): p. 166-74.
13. Kurowski, P. and A. Kubo, The relationship of degeneration of the intervertebral disc to mechanical loading conditions on lumbar vertebrae. Spine, 1986. **11**(7): p. 726-31.
14. Szirmai, J.A., Structure of the intervertebral disc: Chemistry and Molecular Biology of the intracellular Matrix. Academic Press, London, 1970. **3**: p. 1279-1308.
15. Eyre, D.R., Biochemistry of the intervertebral disc. Int Rev Connect Tissue Res, 1979. **8**: p. 227-91.
16. Eyre, D.R. and H. Muir, Quantitative analysis of types I and II collagens in human intervertebral discs at various ages. Biochim Biophys Acta, 1977. **492**(1): p. 29-42.
17. Ashton, I.K., et al., Substance P in intervertebral discs. Binding sites on vascular endothelium of the human annulus fibrosus. Acta Orthop Scand, 1994. **65**(6): p. 635-9.
18. Coppes, M.H., et al., Innervation of "painful" lumbar discs. Spine, 1997. **22**(20): p. 2342-9; discussion 2349-50.
19. Moore, R.J., The vertebral end-plate: what do we know? Eur Spine J, 2000. **9**(2): p. 92-6.
20. Holm, S., et al., Nutrition of the intervertebral disc: solute transport and metabolism. Connect Tissue Res, 1981. **8**(2): p. 101-19.
21. Wallace, A.L., et al., Humoral regulation of blood flow in the vertebral endplate. Spine, 1994. **19**(12): p. 1324-8.
22. Hirsch, C., B.E. Ingelmark, and M. Miller, The anatomical basis for low back pain. Studies on the presence of sensory nerve endings in ligamentous, capsular and intervertebral disc structures in the human lumbar spine. Acta Orthop Scand, 1963. **33**: p. 1-17.
23. Konttinen, Y.T., et al., Transforming and epidermal growth factors in degenerated intervertebral discs. J Bone Joint Surg Br, 1999. **81**(6): p. 1058-63.
24. Krag, M.H., et al., Internal displacement distribution from in vitro loading of human thoracic and lumbar spinal motion segments: experimental results and theoretical predictions. Spine, 1987. **12**(10): p. 1001-7.
25. Schnebel, B.E., et al., A digitizing technique for the study of movement of intradiscal dye in response to flexion and extension of the lumbar spine. Spine, 1988. **13**(3): p. 309-12.
26. Kolditz, D., J. Kramer, and R. Gowin, [Water and electrolyte content of human intervertebral disks under varying load]. Z Orthop Ihre Grenzgeb, 1985. **123**(2): p. 235-8.
27. Panjabi, M.M., et al., In vivo measurements of spinal column vibrations. J Bone Joint Surg Am, 1986. **68**(5): p. 695-702.
28. Jensen, M.V. and F. Tuchsen, [Occupation and lumbar disk prolapse]. Ugeskr Laeger, 1995. **157**(11): p. 1519-23.
29. Pope, M.H., M. Magnusson, and D.G. Wilder, Kappa Delta Award. Low back pain and whole body vibration. Clin Orthop, 1998(354): p. 241-8.

30. Wilder, D.G., et al., Vibration and the human spine. Spine, 1982. **7**(3): p. 243-54.
31. Nachemson, A., The load on lumbar disks in different positions of the body. Clin Orthop, 1966. **45**: p. 107-22.
32. Nachemson, A. and J.M. Morris, In Vivo Measurements of Intradiscal Pressure. Discometry, a Method for the Determination of Pressure in the Lower Lumbar Discs. J Bone Joint Surg Am, 1964. **46**: p. 1077-92.
33. Zetterberg, C., G.B. Andersson, and A.B. Schultz, The activity of individual trunk muscles during heavy physical loading. Spine, 1987. **12**(10): p. 1035-40.
34. Bartelink, D.L., The role of abdominal pressure in relieving the pressure on the lumbar intervertebral discs. J Bone Joint Surg Br, 1957. **39-B**(4): p. 718-25.
35. Taylor, T.K., et al., Spinal biomechanics and aging are major determinants of the proteoglycan metabolism of intervertebral disc cells. Spine, 2000. **25**(23): p. 3014-20.
36. Kretschmer, H., Bandscheibenleiden: Diagnose und Therapie. 1989: Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
37. Brügger, A., Über vertebrale, radikuläre und pseudoradikuläre Syndrome, Teil 2. Vol. 9. 1962: Documenta Geigy.
38. Schleberger, R., Diagnose und konservative Behandlung bandscheibenbedingter Erkrankungen der Lendenweibelsäule. Fortschr. Med., 1985. **103**(22).
39. Zilch, H. and U. Weber, Lehrbuch der Orthopädie mit Repetitorium. 1988: De Gruyter, Berlin, New York.
40. Haan, J. and E. Müller, Lumbale Bandscheibe. Inform Arzt, 1981. **9**(4): p. 60-63.
41. Krämer, J. and W. Klein, Das Postdiskotomiesyndrom. Orthop. Prax., 1980. **1**(20).
42. Zenz, M., Lehrbuch der Schmerztherapie; Grundlagen, Theorie und Praxis für Aus- und Weiterbildung. 1993: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
43. Melzack, R. and P.D. Wall, Pain mechanisms: a new theory. Science, 1965. **150**(699): p. 971-9.
44. Villiger, E., Die periphere Innervation. Kurze übersichtliche Darstellung des Ursprungs, des Verlaufs und der Ausbreitung des Rückenmarks- und Gehirnnervs sowie der Nerven des autonomen Systems mit Berücksichtigung wichtiger pathologischer Verhältnisse. 12 ed. 1964: Schwabe, Basel, Stuttgart. 207 ff.
45. Omarker, K. and R.R. Myers, Pathogenesis of sciatic pain: role of herniated nucleus pulposus and deformation of spinal nerve root and dorsal root ganglion. Pain, 1998. **78**(2): p. 99-105.
46. Aoki, Y., et al., Local application of disc-related cytokines on spinal nerve roots. Spine, 2002. **27**(15): p. 1614-7.
47. Igarashi, T., et al., 2000 Volvo Award winner in basic science studies: Exogenous tumor necrosis factor-alpha mimics nucleus pulposus-induced neuropathology. Molecular, histologic, and behavioral comparisons in rats. Spine, 2000. **25**(23): p. 2975-80.
48. Freemont, A.J., et al., Nerve ingrowth into diseased intervertebral disc in chronic back pain. Lancet, 1997. **350**(9072): p. 178-81.
49. Park, J.B., et al., Expression of Fas receptor on disc cells in herniated lumbar disc tissue. Spine, 2001. **26**(2): p. 142-6.
50. Ashton, I.K., et al., Neuropeptides in the human intervertebral disc. J Orthop Res, 1994. **12**(2): p. 186-92.
51. Chang, M.M., S.E. Leeman, and H.D. Niall, Amino-acid sequence of substance P. Nat New Biol, 1971. **232**(29): p. 86-7.
52. von Euler, U.S. and J.H. Gaddum, An unidendified depressor substance in certain tissue extraxts. J. Physiol., London, 1931. **72**: p. 74-87.
53. Palmgren, T., et al., Immunohistochemical demonstration of sensory and autonomic nerve terminals in herniated lumbar disc tissue. Spine, 1996. **21**(11): p. 1301-6.
54. Loesch, A., et al., Electron-immunocytochemistry of peptides in endothelial cells of rabbit cerebral vessels following perfusion with a perfluorocarbon emulsion. Brain Res, 1993. **611**(2): p. 333-7.
55. Stones, R.W., et al., Substance P: endothelial localization and pharmacology in the human ovarian vein. Obstet Gynecol, 1995. **85**(2): p. 273-8.
56. Cioni, C., et al., Enhanced secretion of substance P by cytokine-stimulated rat brain endothelium cultures. J Neuroimmunol, 1998. **84**(1): p. 76-85.
57. Metwali, A., et al., Eosinophils within the healthy or inflamed human intestine produce substance P and vasoactive intestinal peptide. J Neuroimmunol, 1994. **52**(1): p. 69-78.
58. Mantyh, P.W., et al., Autoradiographic localization and characterization of tachykinin receptor binding sites in the rat brain and peripheral tissues. J Neurosci, 1989. **9**(1): p. 258-79.
59. Hokfelt, T., et al., Substance p: localization in the central nervous system and in some primary sensory neurons. Science, 1975. **190**(4217): p. 889-90.

60. Minota, S., N.J. Dun, and A.G. Karczmar, Substance P-induced depolarization in sympathetic neurons: not simple K-inactivation. Brain Res, 1981. **216**(1): p. 224-8.
61. Stanfield, P.R., Y. Nakajima, and K. Yamaguchi, Substance P raises neuronal membrane excitability by reducing inward rectification. Nature, 1985. **315**(6019): p. 498-501.
62. Ashton, I.K. and S.M. Eisenstein, The effect of substance P on proliferation and proteoglycan deposition of cells derived from rabbit intervertebral disc. Spine, 1996. **21**(4): p. 421-6.
63. Mantyh, P.W., Substance P and the inflammatory and immune response. Ann N Y Acad Sci, 1991. **632**: p. 263-71.
64. DeRose, V., et al., Substance P increases neutrophil adhesion to bronchial epithelial cells. J Immunol, 1994. **152**(3): p. 1339-46.
65. Werner, H., et al., Interaction between lymphocytes and neurotransmitters. Ann N Y Acad Sci, 1987. **496**: p. 312-5.
66. Halliday, D.A., et al., The substance P fragment SP-(7-11) increases prostaglandin E2, intracellular Ca2+ and collagenase production in bovine articular chondrocytes. Biochem J, 1993. **292 (Pt 1)**: p. 57-62.
67. Imasato, H., et al., Objective evaluation of pain in various spinal diseases: neuropeptide immunoreactivity in the cerebrospinal fluid. Spinal Cord, 1997. **35**(11): p. 757-62.
68. Gearing, A.J., et al., Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. Nature, 1994. **370**(6490): p. 555-7.
69. Olmarker, K., et al., Inflammatogenic properties of nucleus pulposus. Spine, 1995. **20**(6): p. 665-9.
70. Martel-Pelletier, J., et al., The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. Identification as the type I receptor and analysis of binding kinetics and biologic function. Arthritis Rheum, 1992. **35**(5): p. 530-40.
71. Waage, A., et al., Local production of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and interleukin 6 in meningococcal meningitis. Relation to the inflammatory response. J Exp Med, 1989. **170**(6): p. 1859-67.
72. Hirano, T., et al., Biological and clinical aspects of interleukin 6. Immunol Today, 1990. **11**(12): p. 443-9.
73. Tilg, H., et al., Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. Blood, 1994. **83**(1): p. 113-8.
74. Akira, S., T. Taga, and T. Kishimoto, Interleukin-6 in biology and medicine. Adv Immunol, 1993. **54**: p. 1-78.
75. Park, J.B., H. Chang, and J.K. Lee, Quantitative analysis of transforming growth factor-beta 1 in ligamentum flavum of lumbar spinal stenosis and disc herniation. Spine, 2001. **26**(21): p. E492-5.
76. Tolonen, J., et al., Transforming growth factor beta receptor induction in herniated intervertebral disc tissue: an immunohistochemical study. Eur Spine J, 2001. **10**(2): p. 172-6.
77. Benbow, U., et al., Characterization of the 46-kDa intermediates of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1) obtained by site-directed mutation of phenylalanine 83. J Biol Chem, 1996. **271**(18): p. 10715-22.
78. Roberts, S., et al., Matrix metalloproteinases and aggrecanase: their role in disorders of the human intervertebral disc. Spine, 2000. **25**(23): p. 3005-13.
79. Edwards, D.R., et al., Differential effects of transforming growth factor-beta 1 on the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in young and old human fibroblasts. Exp Gerontol, 1996. **31**(1-2): p. 207-23.
80. Kanemoto, M., et al., Immunohistochemical study of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 human intervertebral discs. Spine, 1996. **21**(1): p. 1-8.
81. Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-254.
82. Specchia, N., et al., Cytokines and growth factors in the protruded intervertebral disc of the lumbar spine. Eur Spine J, 2002. **11**(2): p. 145-51.
83. Nishida, K., et al., Modulation of the biologic activity of the rabbit intervertebral disc by gene therapy: an in vivo study of adenovirus-mediated transfer of the human transforming growth factor beta 1 encoding gene. Spine, 1999. **24**(23): p. 2419-25.
84. Afrah, A.W., et al., Spinal substance P release in vivo during the induction of long-term potentiation in dorsal horn neurons. Pain, 2002. **96**(1-2): p. 49-55.
85. Harrison, S. and P. Geppetti, Substance p. Int J Biochem Cell Biol, 2001. **33**(6): p. 555-76.
86. Burke, J.G., et al., Intervertebral discs which cause low back pain secrete high levels of proinflammatory mediators. J Bone Joint Surg Br, 2002. **84**(2): p. 196-201.
87. Dandona, P., et al., Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients: fall with weight loss. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(8): p. 2907-10.

88. Melrose, J., et al., Spatial and temporal localization of transforming growth factor-beta, fibroblast growth factor-2, and osteonectin, and identification of cells expressing alpha-smooth muscle actin in the injured anulus fibrosus: implications for extracellular matrix repair. Spine, 2002. **27**(16): p. 1756-64.
89. Edwards, D.R., et al., Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. Embo J, 1987. **6**(7): p. 1899-904.
90. Crean, J.K., et al., Matrix metalloproteinases in the human intervertebral disc: role in disc degeneration and scoliosis. Spine, 1997. **22**(24): p. 2877-84.
91. Olmarker, K., et al., Effects of methylprednisolone on nucleus pulposus-induced nerve root injury. Spine, 1994. **19**(16): p. 1803-8.
92. Haro, H., et al., Matrix metalloproteinase-7-dependent release of tumor necrosis factor- alpha in a model of herniated disc resorption. J Clin Invest, 2000. **105**(2): p. 143-50.
93. Arend, W.P., Interleukin-1 receptor antagonist. Adv Immunol, 1993. **54**: p. 167-227.
94. Vincenti, M.P., I.M. Clark, and C.E. Brinckerhoff, Using inhibitors of metalloproteinases to treat arthritis. Easier said than done? Arthritis Rheum, 1994. **37**(8): p. 1115-26.
95. Gordon, J.L., A.H. Drummond, and W.A. Galloway, Metalloproteinase inhibitors as therapeutics. Clin Exp Rheumatol, 1993. **11 Suppl 8**: p. S91-4.
96. Thompson, J.P., T.R. Oegema, Jr., and D.S. Bradford, Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth factors. Spine, 1991. **16**(3): p. 253-60.
97. Siddall, P.J. and M.J. Cousins, Spinal pain mechanisms. Spine, 1997. **22**(1): p. 98-104.
98. Buckwalter, J.A., Aging and degeneration of the human intervertebral disc. Spine, 1995. **20**(11): p. 1307-14.

7. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Rüther für die Ermöglichung der Promotion in der von ihm geleiteten Klinik und Poliklinik für Orthopädie, sowie für die Betreuung und Förderung während der gesamten Zeit der Erstellung der Arbeit.

Bei Herrn Dr. med. Nils Hansen-Algenstaedt möchte ich mich herzlich für die kompetente Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten sowie für seine engagierte Unterstützung während der Anfertigung der Dissertation bedanken. Auch Frau PD Dr. med. Petra Algenstaedt möchte ich für die Unterstützung bei der Erstellung der Dissertation danken.

Britta Schwarzloh sowie vielen anderen Mitarbeitern des Laborteams gebührt mein Dank für die Einführung in die Laborarbeit und die hilfreiche Unterstützung bei zahlreichen Experimenten und die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Herzlich möchte ich mich auch bei meinem Freund, meinen Eltern und Geschwistern bedanken, die mir während der Durchführung der Promotion zur Seite standen.

8. LEBENSLAUF

Barbara Dorothea Friedrichs

geboren am 8.6.1976 in Esslingen a. Neckar

1982-1986	Grundschule Sulzgrieß, Esslingen
1986-1995	Luisen Gymnasium, Hamburg-Bergedorf
1995-1996	Auslandsaufenthalt in Mexiko, Sprachkurse
10/1996	Beginn des Studiums der Physik an der Universität Hamburg
04/1997	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Hamburg
03/1999	Ärztliche Vorprüfung
03/2000	Erstes medizinisches Staatsexamen
10/2000	Beginn der Experimente für die Doktorarbeit in der Klinik und Poliklinik für Orthopädie unter der Leitung von Prof. Dr. med. W. Rüther
09/2002	Zweites medizinisches Staatsexamen
12/2003	Drittes medizinisches Staatsexamen
04/2004	Beginn der Tätigkeit als Ärztin im Praktikum in der Klinik für Innere Medizin des Krankenhaus Buchholz, Chefarzt Dr. C. Pott
10/2004	Beginn der Tätigkeit als Assistenzärztin in der Klinik für Innere Medizin des Krankenhaus Buchholz, Chefarzt Dr. C. Pott

Hamburg, den

9. ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich die der Universität Hamburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Proteinbiochemische Mechanismen der algogenen Bandscheibendegeneration: Bedeutung von TNF-α, IL-1α, IL-6, MMP-3, TGF-β1,2,3 und Substanz P

in der Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendrof (Direktor: Prof. Dr. med. W. Rüther) unter der Betreuung von Herrn Dr. med. Nils Hansen-Algenstaedt ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Hamburg, den