

Untersuchungen zu regenerativen und anti-inflammatorischen Therapiekonzepten der Bandscheibendegeneration im Organkulturmodell

1. Einleitung

Ziel der Studie war es, in einem bovinen Bandscheiben-Organkulturmodell regenerative Behandlungsmethoden der Bandscheibendegeneration mit Hilfe eines zelltherapeutischen und eines biomaterial-basierten Ansatzes zu simulieren.

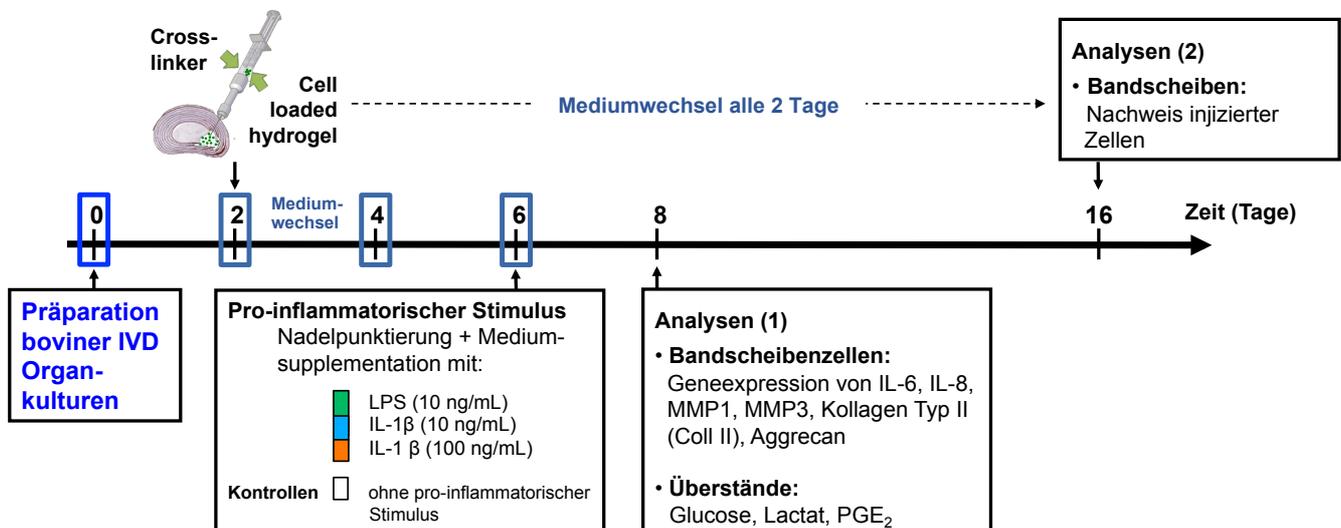
Dazu wurden im Organkulturmodell degenerative und inflammatorische Umgebungsbedingungen erzeugt und die Effekte auf die metabolische Aktivität der Zellen, Entzündungsmarker sowie den Matrixauf- und abbau untersucht. Unter Verwendung eines Albumin/Hyaluronsäure-Hydrogels als Trägermaterial wurde der Einfluss eines degenerativen Environments auf die Überlebensfähigkeit, Migration und Matrixsyntheseleistung injizierter Zellen bei ausreichender Nährstoffversorgung und unter Simulation eines degenerativen Nährstoffmangels vergleichend charakterisiert.

Mit Hilfe eines biomaterial-basierten Drug-Delivery-Systems wurde unter Verwendung von Nanopartikel und einer Substanz mit bekannter anti-inflammatorischer Wirkung (Diclofenac) untersucht ob dadurch entzündungshemmende bzw. regenerative Prozesse durch Rekrutierung von Zellen stimulieren können. Dazu wurde durch Zusatz von Entzündungsfaktoren (Interleukin IL1 β und Tumor Necrosis Factor TNF α) im In-vitro-Modell eine inflammatorische Antwort erzeugt, die dann mit den oben aufgeführten Strategien (entzündungshemmend bzw. regenerativ) behandelt wurden. Über die Analyse von Matrixauf- und abbau (Genexpression), Inflammation (Immunhistochemie) und Zellmigration wurden die Möglichkeiten dieser Therapieansätze bezüglich Entzündungsreduktion und Rekrutierung von Zellen aus der Bandscheibenumgebung vergleichend charakterisiert.

2. Material und Methoden

2.1. Bovines Organkulturmodell

Aus den kaudalen Bandscheiben von Rindern wurden die Bandscheiben isoliert und daraus standardisierte Stanzen präpariert. Das Versuchsschema ist hier dargestellt (Abb.1):



Untersuchungen zu regenerativen und anti-inflammatorischen Therapiekonzepten der Bandscheibendegeneration im Organkulturmodell

Basierend auf unseren Vorarbeiten wurden diese Stanzanzen zunächst für 6 Tage vorkultiviert. Zur Verhinderung der Quellung wurden die Bandscheiben in einem "belasteten" Kultursystem mit Membranfilter-Inserts kultiviert (siehe Abb. 2). Der Versuchsaufbau verhinderte ein Aufquellen des Gewebes und ermöglichte eine bessere Standardisierung des Kultursystems (siehe Ergebnis-Tafel Abb.3).

Zu Versuchsbeginn am Tag 0 erfolgte die Präparation der Bandscheiben-Organokulturen, wie hier in Abbildung 2 dargestellt. Dazu wurden kaudale Bandscheiben aus der Schanz-Wirbelsäule frisch geschlachteter Rinder (Alter < 24 Monate) präpariert und daraus standardisierte Stanzpräparate hergestellt um einheitlich große Präparate für die Versuche zu erhalten.

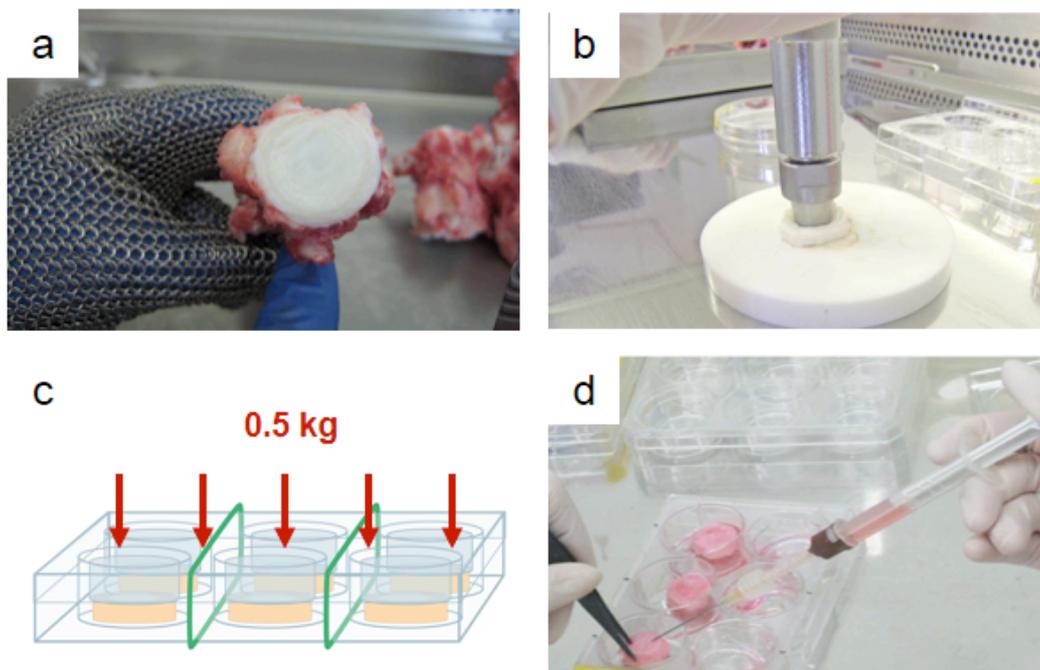


Abb. 2: Präparation boviner Bandscheiben-Organokulturen (a), Stanzpräparat (\varnothing 13 mm) des Nucleus pulposus mit umgebenden Anuluslamellen (b), Schema des Organkultur-Modells mit Membranfilter-Inserts auf den Bandscheibenstanzen und Gewicht (0,5 kg) auf dem Deckel der 6-Well-Platte zur Verhinderung der Quellung der Bandscheiben im Kulturverlauf (c), Injektion von Zellen in einem Hydrogel-Trägermaterial mit Hilfe einer Doppelkammerspritze (d).

2.2. Simulation degenerativer und pro-inflammatorischer Bedingungen (WP1 / WP2)

1.2.1 Simulation degenerativer Kulturbedingungen:

Durch Variation der Zusammensetzung des Nährmediums wurden degenerative Umgebungsbedingungen simuliert. Unter Normalbedingungen wurden die Organokulturen mit Standard-Bandscheiben (DMEM 5% FBS, 1% L-glutamine, 1% NEA (non-essential amino acids) 1% Penicillin/Streptomycin, 0.5% Fungizone (alles von Biochrom) 400 mOsm) unter Sauerstoffbedingungen, die für Bandscheiben als physiologisch betrachtet werden (6% O₂) kultiviert. Degenerative Bedingungen wurden durch ein Glucose-reduziertes Nährmedium (0,05 mM Glucose) mit erniedrigter Osmolarität (300 mOsm) und Kultur unter Sauerstoff-Reduktion (2% O₂) simuliert. Das Kulturmedium wurde alle 2 Tage gewechselt.

Untersuchungen zu regenerativen und anti-inflammatorischen Therapiekonzepten der Bandscheibendegeneration im Organkulturmodell

1.2.2 Simulation pro-inflammatorischer Bedingungen

Die Simulation inflammatorischer Bedingungen erfolgte durch Nadelpunktierung und anschließendem Zusatz von LPS bzw. IL-1 β . Nach 6 Tagen Kulturzeit unter Standard-Bedingungen wurden dafür die Organkulturen mit PBS gespült und mit einer sterilen Injektionsnadel (20-gauge) punktiert (siehe Abb. 1d). Danach erfolgte die Kultur der Proben unter Zusatz unterschiedlicher pro-inflammatorischer wirksamer Substanzen. Die Stimulation über 48 Stunden durch Zusatz von bakteriellem LPS (aus *E.coli*) (10 $\mu\text{g/mL}$, Sigma) oder mit rekombinantem humanem IL-1 β . Dabei wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen an IL-1 β ausgetestet (10 and 100 ng/mL, R&D Systems). Unbehandelte Vergleichsansätze (ohne Nadelpunktierung und inflammatorischen Zusätzen) dienten als Kontrollen. Nach zwei Tagen wurden die Proben für die folgenden weiteren Analysen gesammelt: Bestimmung der Zellviabilität, metabolischen Aktivität (Glucose-Verbrauch und Lactat-Bildung), Genexpressionsanalysen, Glycosaminoglycan (GAG)-Bestimmung, Prostaglandin E2 (PGE₂) Analyse sowie histologische Auswertungen. Als Zielgene für die Expressionsanalysen wurde mittels real-time PCR die Expression von inflammatorischen Zytokinen (IL-6, IL-8), Matrixmetalloproteinasen (MMPs, MMP1 and MMP3) und Matrixproteinen (Collagen type II (Coll II), Aggrecan) bestimmt. Die Zellviabilität wurde mit Hilfe eines LIVE/DEAD Assays bestimmt.

2.3. Simulation einer Zelltherapie (WP2) / Untersuchungen zur Zellmigration (WP4)

Die Simulation einer Zelltherapie erfolgte durch Injektion fluoreszenzmarkierter mesenchymaler Stammzellen, die mit Hilfe eines Albumin-Hyaluronsäure-Hydrogel als Trägermaterial in die Gewebeproben injiziert wurden (Abb. 1d). In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass diese nach Inkubationszeiten bis zu 2 Wochen in der bovinen Bandscheibenumgebung nachzuweisen waren.

Ziel unserer Untersuchungen war es zu zeigen, ob durch Applikation mesenchymaler Stammzellen die inflammatorischen Effekte, die zuvor durch Nadelpunktierung und IL-1 β erzeugt wurden verändert oder reduziert wurden. Dazu wurde die Expression der Zielgene für Inflammation, Matrixbildung und Matrixabbau sowie die Prostaglandin E2-Freisetzung analysiert.

Durch die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Kryoschnitten konnte außerdem untersucht werden, ob eine Migration der injizierten Zellen aus dem Albugel-Trägermaterial in die Bandscheibenumgebung erfolgt. Darüber hinaus wurde in Experimenten der portugiesischen Arbeitsgruppe untersucht, ob sich das Migrationsverhalten mesenchymaler Stammzellen durch den Faktor SDF-1 beeinflussen lässt (siehe Abstract Pereira et al.).

Dazu wurde SDF-1 (=Stromal-derived factor 1) ein Chemokin, das die Migration mesenchymaler Stammzellen fördert, in ein Hydrogel (HAP=poly(Nisopropylacrylamide) grafted hyaluronan HAP-NIPAM) eingebracht, das im Rahmen einer anderen Studie als biomaterial-basiertes Freisetzungssystem für die Anwendung in einem Bandscheiben-Organokulturmodell getestet wurde. Das Migrationsverhalten PKH67- markierter humaner mesenchymaler Stammzellen (hMSCs) wurde über einen Zeitraum von 24 Stunden fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

2.4. Anti-inflammatorischer Ansatz mit Nanopartikeln WP3

Zur Simulation eines biomaterial-basierten Therapieansatzes unter Verwendung des anti-inflammatorischen Faktors Diclofenac, wurde ein neuer Ansatz mit Nanopartikeln getestet. Dazu wurden Nanopartikel (NPs) aus Chitosan-(Ch)/Poly-gPGA(glutamic acid) verwendet, die als anti-inflammatorisches Medikament Diclofenac (Df) enthielten. In Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass sich dieses System zur kontrollierten Freisetzung von Pharmaka eignet und im In-vitro-Modell die Aktivierung von Makrophagen reduziert.

Die Nanopartikel wurden 3 Stunden nach Stimulation der Inflammation (siehe 1.3) den Organkulturen zugesetzt. Parallelansätze ohne Nanopartikel-Zusatz dienten als Kontrollen. Die Auswertung der anti-inflammatorischen Antwort erfolgte durch Genexpressionsanalysen und die Bestimmung der Prostaglandin E2 (PGE₂) Produktion.

Untersuchungen zu regenerativen und anti-inflammatorischen Therapiekonzepten der Bandscheibendegeneration im Organkulturmodell

3. Ergebnisse

Schwerpunkt der Untersuchungen war die reproduzierbare Etablierung eines In-vitro-Modells zur Simulation degenerativer und pro-inflammatorischer Bedingungen. Dazu erfolgte eine detaillierte Charakterisierung des Organkultursystems unter belasteten/unbelasteten Bedingungen und nach Simulation degenerativer und inflammatorischer Bedingungen. Zusammenfassend werden hier die Ergebnisse zur Beantwortung der verschiedenen Teil-Fragestellungen des Projekts dargestellt:

3.1. Charakterisierung der Organkulturen:

3.1.1 Morphologische Charakterisierung

Die makroskopische Charakterisierung der Bandscheiben-Organokulturen ganzer (whole disc) und gestanzter (punched disc) Bandscheiben-Organokulturen nach Kultur unter belasteten (loaded) und unbelasteten (unloaded) Bedingungen ist in Abb. 2 dargestellt. Die Bandscheibenhöhe (2b) wurde durch die Verwendung von Membran-Filter-Inserts und Belastung (loaded) deutlich gegenüber der unbelasteten Proben (unloaded) reduziert. Der Durchmesser der Bandscheibenstanzen sowie das Gewicht der Proben zeigte keinen Unterschied zwischen den Behandlungsmethoden.

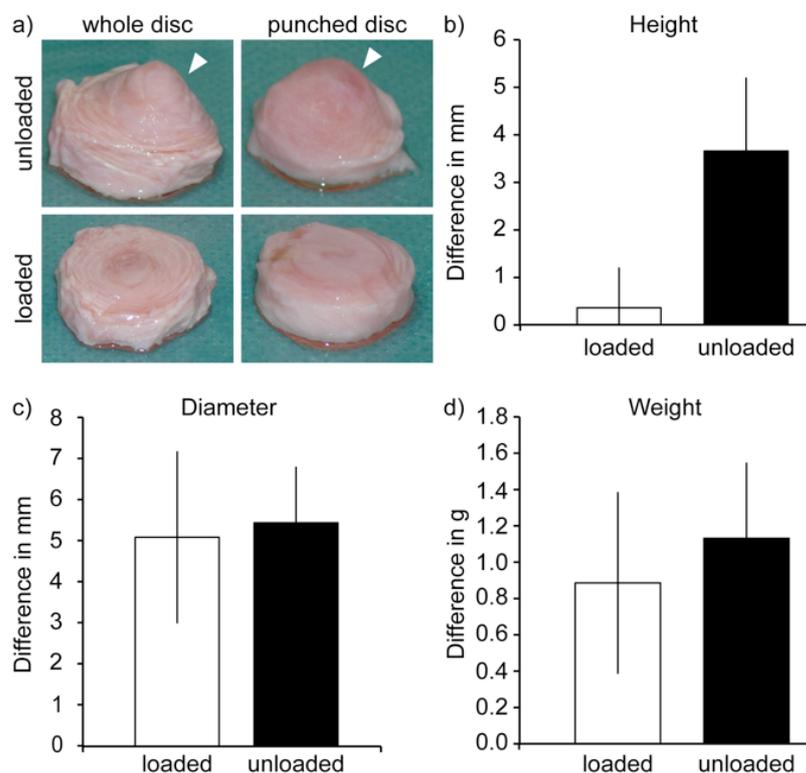


Abb. 3: Makroskopische Charakterisierung der Bandscheiben-Organokulturen: (a) Vergleich ganzer (whole disc) und gestanzter (punched disc) Bandscheiben-Organokulturen nach Kultur unter belasteten (loaded) und unbelasteten (unloaded) Bedingungen. Einfluss der unterschiedlichen Behandlungen auf die Bandscheibenhöhe (b), den Durchmesser der Gewebeprobe (c) sowie das Probengewicht (d). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen von 7 gemessenen Proben (weiß: nach Belastung, schwarz: unbelastete Bedingungen).

Untersuchungen zu regenerativen und anti-inflammatorischen Therapiekonzepten der Bandscheibendegeneration im Organkulturmodell

3.1.2 Histologische und biochemische Charakterisierung der Organkulturen

Über einen Kulturzeitraum von 5 Wochen konnte eine kontinuierlich Abnahme des Proteoglykangehalts in den Organkulturen festgestellt werden, was sich durch eine Abschwächung der Alcianblau-Färbung (Abb. 3a) und durch einen Anstieg der Glykosaminoglykan-Konzentration (GAG) im Medienüberstand zeigte (Abb. 3b). Unter belasteten und unbelasteten Bedingungen waren die Ergebnisse vergleichbar.

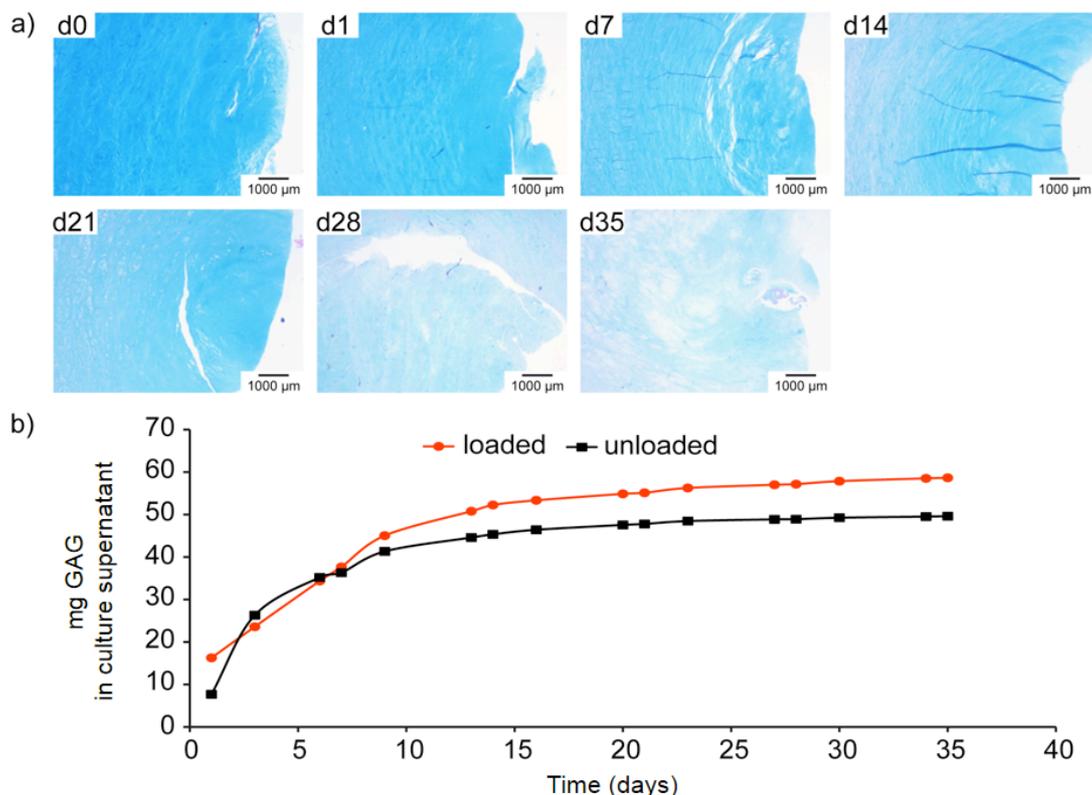


Abb. 4: Freisetzung von Proteoglykanen (Glykosaminoglycan GAG) aus der Bandscheibenmatrix im Kulturverlauf. Repräsentative Bilder von Alcian-Blau-gerärbten Bandscheibenstanzen nach unterschiedlich langer Kulturzeit (Tag 0, 1, 7, 14, 21, 28 und 35) über einen Gesamtzeitraum von 5 Wochen (a). Die GAG-Freisetzung in das Nährmedium wurde in Überstands-Proben DMMB Assay bestimmt. Kumulierte Darstellung der Analyse jeweils einer Bandscheibenstanze desselben Spenders unter belasteten (rote Kurve) und unbelasteten (schwarze Kurve) Bedingungen.

3.2. Kann im Organkultursystem eine inflammatorische Antwort erzeugt werden?

3.2.1 Einfluss der inflammatorischen Stimulation auf die Genexpression

Zur Untersuchung des Einflusses einer pro-inflammatorischen Stimulation auf den Matrixauf- und Abbau der Bandscheibe wurde die Expression verschiedener Zielgene für Matrixproteine, Enzyme des Matrixumbaus sowie inflammatorische Faktoren mittels real-time PCR untersucht. Dazu wurden spezifische Primer für die entsprechenden Zielgene in Vorversuchen getestet und deren Expression durch die Zellen der Bandscheibenorgankulturen nach RNA-Isolation und cDNA-Gewinnung

Untersuchungen zu regenerativen und anti-inflammatorischen Therapiekonzepten der Bandscheibendegeneration im Organkulturmodell

bestimmt. Die Geneexpression wurde jeweils auf das Housekeeping-Gen GAPDH normalisiert und Bezug auf die Kontrollansätze, die keiner inflammatorischen Stimulation ausgesetzt wurden, dargestellt.

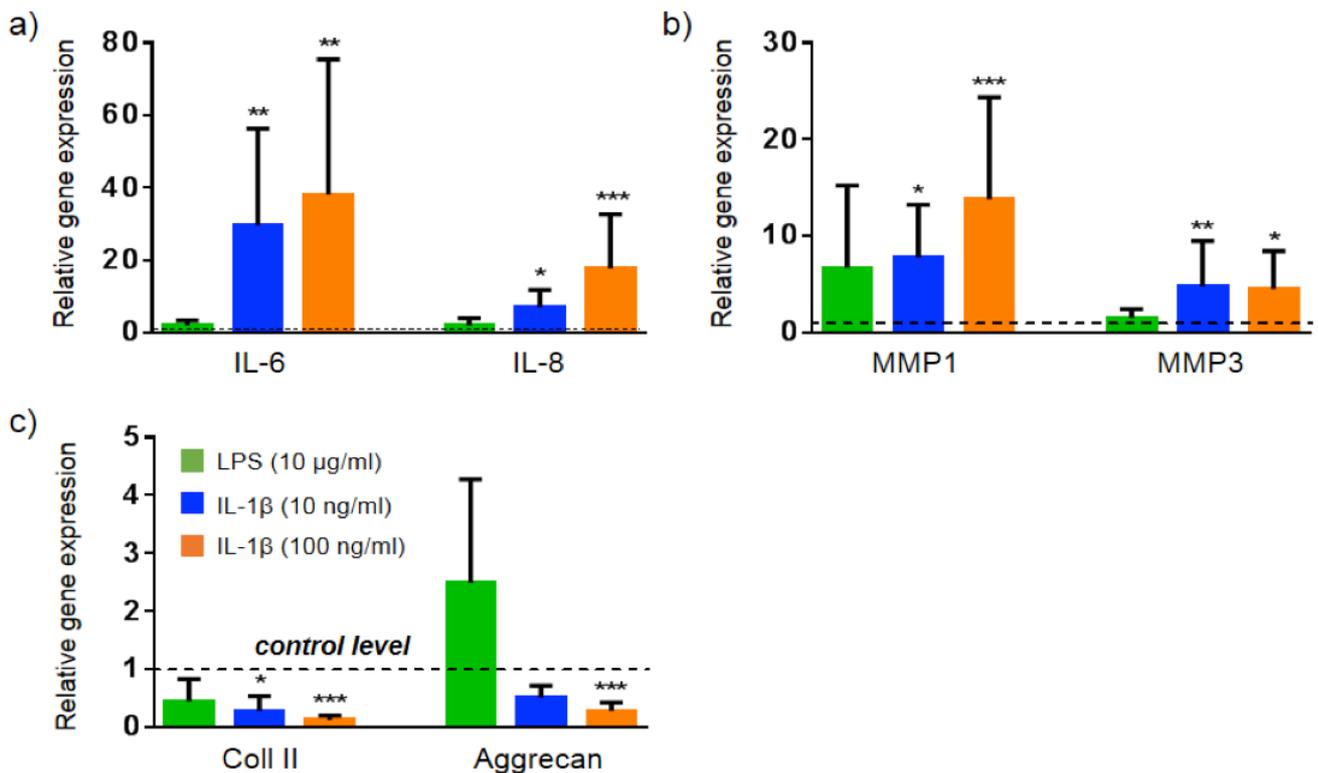


Abb. 5: Quantitative Analyse der Expression von Zielgenen für Inflammation (a), Matrixabbau (b) und Matrixbildung (c) nach pro-inflammatorischer Stimulation mit LPS (Lipopolysaccharid) oder Interleukin-1 β (IL-1 β). Die Expression der Zytokine Interleukin 6 (IL-6) und IL-8 (a), Matrix-Metalloproteinasen MMP-1 und MMP-3 (b) sowie der Matrixproteine Kollagen-Typ II (Coll II) und Aggrecan (c) wurde auf GAPDH normalisiert und in Relation zu den unbehandelten Kontrollen ohne inflammatorische Stimulation dargestellt. (n=4 für LPS und n=10 für IL-1 β). * = p<0.05; ** = p<0.025; *** = p<0.001 (Wilcoxon test zum Vergleich der LPS Gruppe mit den Kontrollen, Friedman-Test zum Vergleich der IL-1 β -Gruppen mit den Kontrollen und zum Vergleich der Gruppen untereinander).

Wir konnten eine signifikante Erhöhung der Expression von IL-6, IL-8, MMP-1 und MMP-8 für die Behandlung mit beiden Dosierungen von IL-1 β (10 ng/mL und 100 ng/mL) feststellen. Die Expression des Matrixproteins Coll II wurde durch beide Dosierungen von IL-1 β (10 ng/mL und 100 ng/mL) signifikant erniedrigt. Eine signifikante Erniedrigung der Aggrecan-Expression wurde unter Zusatz der höheren IL-1 β -Dosierung (100 ng/mL) beobachtet. Die Behandlung mit LPS führte zu keiner statistisch signifikanten Veränderung der Genexpression.

3.2.2 Einfluss der inflammatorischen Stimulation auf die Prostaglandin E2 Synthese:

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen, die auf eine inflammatorische Antwort Organkultursystem hindeuten, konnten durch die Analyse der Prostaglandin-Freisetzung unterstützt werden (Abb. 6).

Untersuchungen zu regenerativen und anti-inflammatorischen Therapiekonzepten der Bandscheibendegeneration im Organkulturmodell

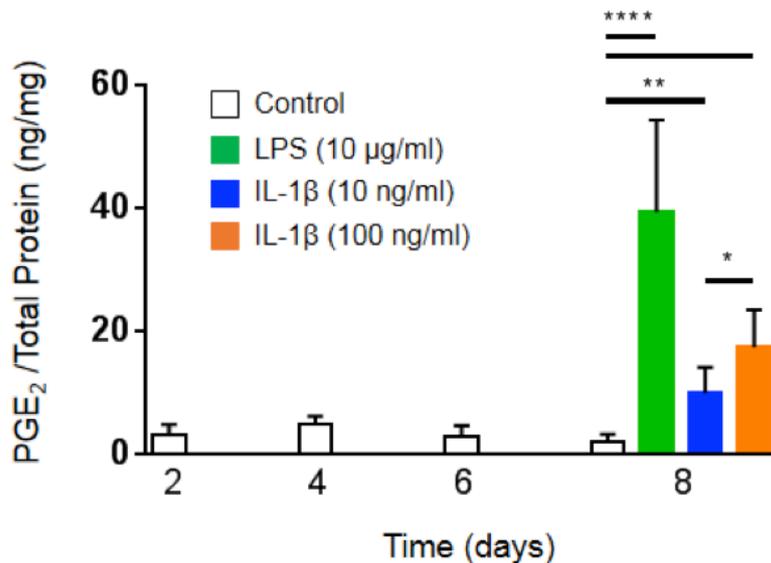


Abb. 6: Die Prostaglandin E_2 (PGE_2) Konzentration in den Medienüberständen der Bandscheiben-Organokulturen wurde unter Anwesenheit eines pro-inflammatorischen Stimulus verändert. Dargestellt ist hier die Kinetik der PGE_2 -Produktion gemessen mittels ELISA über einen Kulturzeitraum von 8 Tagen. Die Stimulation mit LPS ($10 \mu\text{g/ml}$) oder IL-1 β (10 bzw. 100 ng/ml) erfolgte am Tag 6. Zuvor wurden die Organokulturen wie unter 1.1 beschrieben unter Standard-Bedingungen kultiviert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte und Standard-Abweichungen dargestellt ($n=14$ für LPS und $n=23$ für IL-1 β). Statistik: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.025$; **** = $p < 0.0001$ (Kruskal-Wallis Test).

Wir konnten zeigen, dass die Behandlung der Organokulturen mit inflammatorischen Stimuli zu einer signifikanten Erhöhung der Prostaglandin- E_2 -Freisetzung führte. Dieses Ergebnis unterstützt die Eignung des hier beschriebenen Organokulturmodells zur In-vitro-Simulation einer inflammatorischen Reaktion und zur Testung anti-inflammatorischer Behandlungsstrategien. Die Ergebnisse erster Versuche zu dieser Teilfragestellung sind unter 3.3 zusammenfassend dargestellt.

3.2.3 Einfluss des inflammatorischen Environments auf Zellviabilität und Stoffwechselaktivität:

Die wichtige Frage, ob sich die Stoffwechselaktivität der Zellen in den Bandscheiben-Organokulturen sowie deren Viabilität unter den hier simulierten inflammatorischen Bedingungen verändert, wurde durch Viabilitätstest, Messung des Glucose-Verbrauchs und Lactat-Bestimmung untersucht.

Der LIVE/DEAD Assay zeigte keine Unterschiede zwischen den Kulturbedingungen (Abb. 7a). Etwa 80-90% der Zellen waren vital. Daraus kann geschlossen werden, dass die hier verwendeten inflammatorischen Bedingungen die Zellviabilität nicht beeinträchtigen. Auch der niedrige Sauerstoff-Partialdruck beeinträchtigte die Viabilität nicht.

Auch der Glucose-Verbrauch und die Milchsäure-Bildung zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den behandelten Gruppen und den nicht behandelten Kontrollen (Abb. 7b, c). Diese Ergebnisse bekräftigen die Befunde zur Zellviabilität, die ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Gruppen erkennen ließen. Es ist wichtig zu erwähnen, dass die Glucose-Konzentration im Medium immer oberhalb der kritischen Grenze von $0,2 \text{ g/L}$ lag. Damit konnten Mangelbedingungen ausgeschlossen werden. Auch die Lactat-Bildung überstieg nicht den kritischen Wert von $0,8 \text{ g/L}$ und lag damit weit unterhalb des kritischen Wertes ($3,2 \text{ g/L}$), der nach Literaturangaben als Inhibitor für

Untersuchungen zu regenerativen und anti-inflammatorischen Therapiekonzepten der Bandscheibendegeneration im Organkulturmodell

MSC-Kulturen angegeben wird. Diese Faktoren sind für die Beurteilung zukünftiger Test-Verfahren zur Injektion von MSCs wichtig.

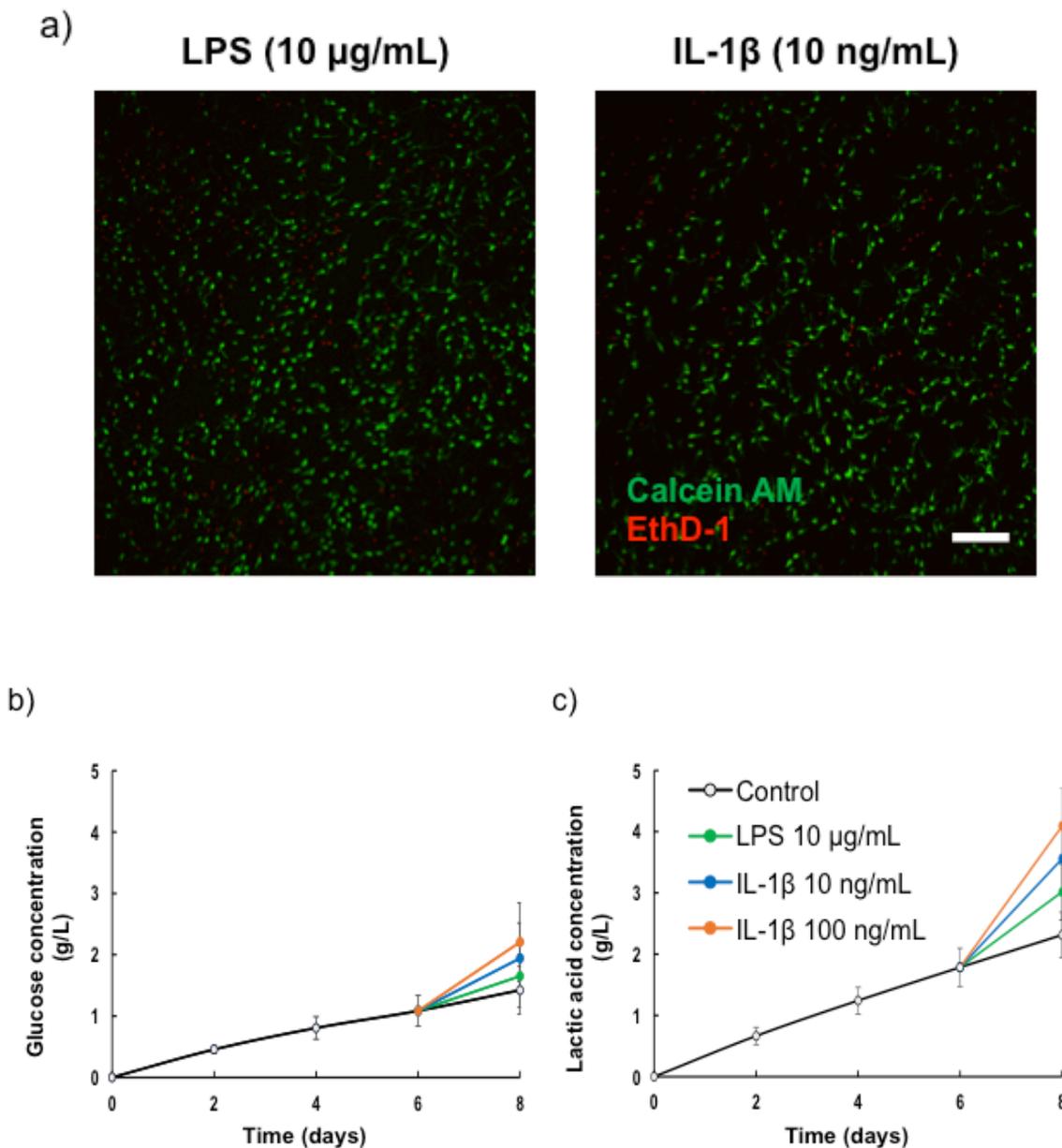


Abb. 7: Zellviabilität (a) und Stoffwechsel-Aktivität (b, c) über den Kulturverlauf der Organkulturen von 8 Tagen. (a) Repräsentative CLSM-Aufnahmen (confocal laser scanning microscope, z-stacks) des LIVE/DEAD Zytotoxizitäts/Viabilitäts-Assays von Tag 8 (Calcein AM färbt lebende Zellen grün; EthD-1 färbt tote Zellen rot; – 200 µm). (b) Glucose und (c) Milchsäure (lactic acid) Konzentration (g/L) in Medium-Überständen (n=21-25).

Untersuchungen zu regenerativen und anti-inflammatorischen Therapiekonzepten der Bandscheibendegeneration im Organkulturmodell

3.3. Untersuchungen zur Zelltherapie:

3.3.1 Kann eine Zellmigration oder Zellrekrutierung beobachtet werden?

An ausgewählten Kryoschnitten von Organkulturen, in die fluoreszenzmarkierte Zellen injiziert wurden, konnte deren Migrationsverhalten untersucht werden. Durch die Fluoreszenzfärbung der Zellen war es möglich diese nach der Injektion wieder im Gewebe zu identifizieren und evtl. stattfindende Migrationsreaktionen zu verfolgen. Es konnten in keiner der untersuchten Gewebeproben Zellen außerhalb des injizierten Bereichs identifiziert werden, was darauf hindeutet, dass zumindest im hier untersuchten Kulturzeitraum keine Zellmigration stattfindet.

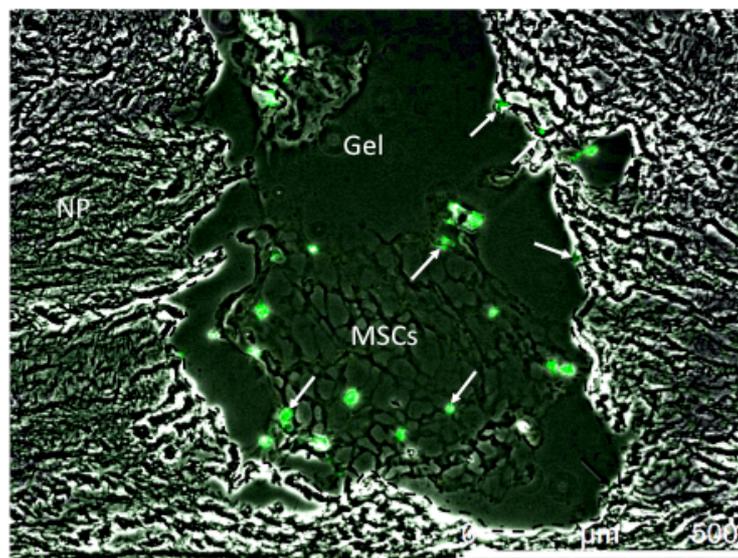


Abb. 8: Kryoschnitt einer Bandscheibenorgankultur, in die ein Hydrogel mit fluoreszenz-markierten Zellen (hMSCs - gefärbt mit PKH67) injiziert wurde. Die Grenze zwischen dem Gelinjektionsort und dem umgebenden Bandscheibengewebe des Nucleus pulposus (NP) ist deutlich erkennbar. Zellen konnten nur innerhalb des Gels nachgewiesen werden.

Es ist anzunehmen, dass es hierfür eines zusätzlichen Stimulus durch ein migrationsförderndes Zytokin bedarf. Dieser Teilaspekt des ursprünglich geplanten WP4 konnte aus zeitlichen Gründen hier nicht im ursprünglich geplanten Umfang untersucht werden weshalb wir uns auf die Überprüfung der Zellmigration an Kryoschnitten der Organkulturversuche beschränkt haben. Wegen des erweiterten Untersuchungsspektrums in den anderen Arbeitspaketen wurde dieser Teilaspekt im Rahmen einer umfangreicheren Studie der portugiesischen Arbeitsgruppe untersucht.

Zusammenfassend wurden hierfür unter Verwendung des migrationsfördernden Chemokins SDF-1 in einem bovinen Organkultursystem Versuche zur Testung einer möglichen Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen aus der Bandscheibenumgebung durchgeführt. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass SDF-1 kontinuierlich aus einem Hyaluron-Gel-Trägermaterial (HAP) freigesetzt wird, wobei die stärkste Freisetzung während der ersten 48 Stunden erfolgt und sich dann ein Gleichgewicht über 7 Tage einstellt. Dieses mit SDF-1 versetzte Trägermaterial wurde in einen zuvor erzeugten Hohlraum boviner Bandscheiben-Organokulturen injiziert. Die Migration humaner fluoreszenzmarkierter mesenchymaler Stammzellen (hMSCs), die den Organokulturen zugesetzt wurden erfolgte durch Auszählung der Zellen in den Bandscheiben. Innerhalb von 48 Stunden konnte eine verstärkte Rekrutierung von hMSCs festgestellt werden, wenn den Kulturen das Chemokin SDF-1 zugesetzt wurde. Ohne Zusatz von SDF-1 fand keine Zellmigration statt. Diese Befunde bestätigen

Untersuchungen zu regenerativen und anti-inflammatorischen Therapiekonzepten der Bandscheibendegeneration im Organkulturmodell

unsere eigenen Ergebnisse, die ebenfalls darauf hindeuten, dass injizierte Zellen ohne zusätzlichen Migrationsstimulus am Injektionsort verbleiben und keine Migration zeigen.

3.4. Testung anti-inflammatorischer Strategien

3.4.1 Biomaterial-basierter Ansatz durch Zusatz von Nanopartikeln mit Diclofenac

Die ersten Ergebnisse zur anti-inflammatorischen Wirkung von Nanopartikeln (NPs als Diclofenac (Df)-Freisetzungssystem) zeigten in Organkulturen, in denen durch Zusatz von Interleukin IL1 β eine inflammatorische Reaktion erzeugt wurde, eine Erniedrigung der PGE₂-Konzentration wenn NPs mit Diclofenac verwendet wurden (Abb. 9). In Kontrollen ohne Zusatz von IL-1 β wurden nur geringe PGE₂-Konzentrationen gemessen (schwarze Balken), durch Zusatz von IL-1 β wurde die PGE₂-Konzentration deutlich erhöht (blaue und orange Balken). Die Behandlung mit NPs erniedrigte den Effekt deutlich.

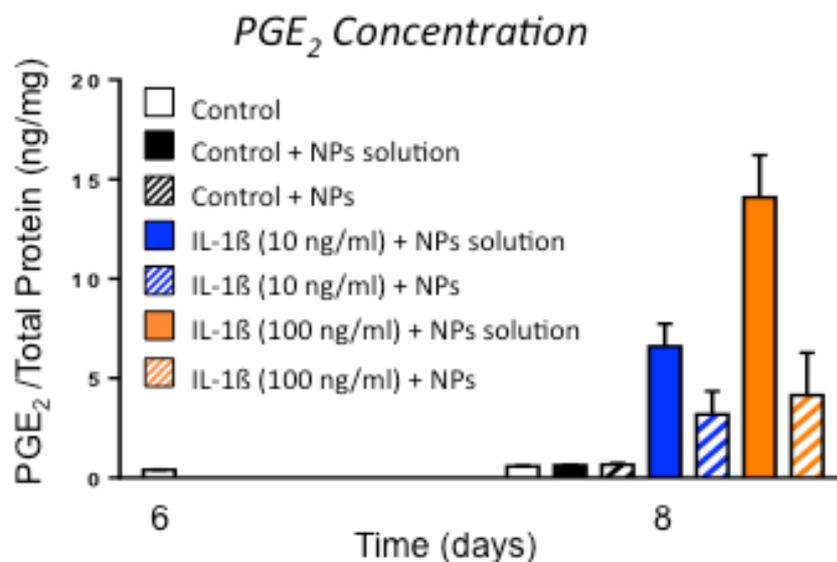


Abb. 9: PGE₂-Konzentration in Medium-Überständen unbehandelter Organkulturen (Control) ohne Zusatz von Interleukin (IL-1 β) oder nach Zusatz des inflammatorischen Stimulus (IL-1 β) und anti-inflammatorischer Behandlung mit Diclofenac-haltigen Nanopartikeln (NPs). Die Analysen erfolgen am Tag 8, 48h nach anti-inflammatorischer Behandlung. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt (n=2-4). (NPs = Nanopartikel, NPs solution = Pufferlösung für NPs)

Dieser anti-inflammatorische Effekt konnte auch durch Genexpressionsanalysen bestätigt werden. Die ersten Ergebnisse zur anti-inflammatorischen Wirkung des NPs-Behandlungsansatzes auf die Expression von Zielgenen für Inflammation und Matrixumbaus sind an Beispielen in Abb. 10 dargestellt. Die pro-inflammatorischen Effekte der IL-1 β -Behandlung, die sich durch eine erhöhte Expression von Interleukinen und MMPs, sowie eine Erniedrigung der Matrixproteinexpression zeigte, konnte durch die Behandlung mit Diclofenac-haltigen Nanopartikeln teilweise deutlich reduziert werden. Erste Ergebnisse zeigten eine Erniedrigung der IL-6 und MMP1-Expression im Vergleich zu den Gruppen, die nur mit IL-1 β stimuliert wurden, aber keine NPs-Behandlung erhielten.

Untersuchungen zu regenerativen und anti-inflammatorischen Therapiekonzepten der Bandscheibendegeneration im Organkulturmodell

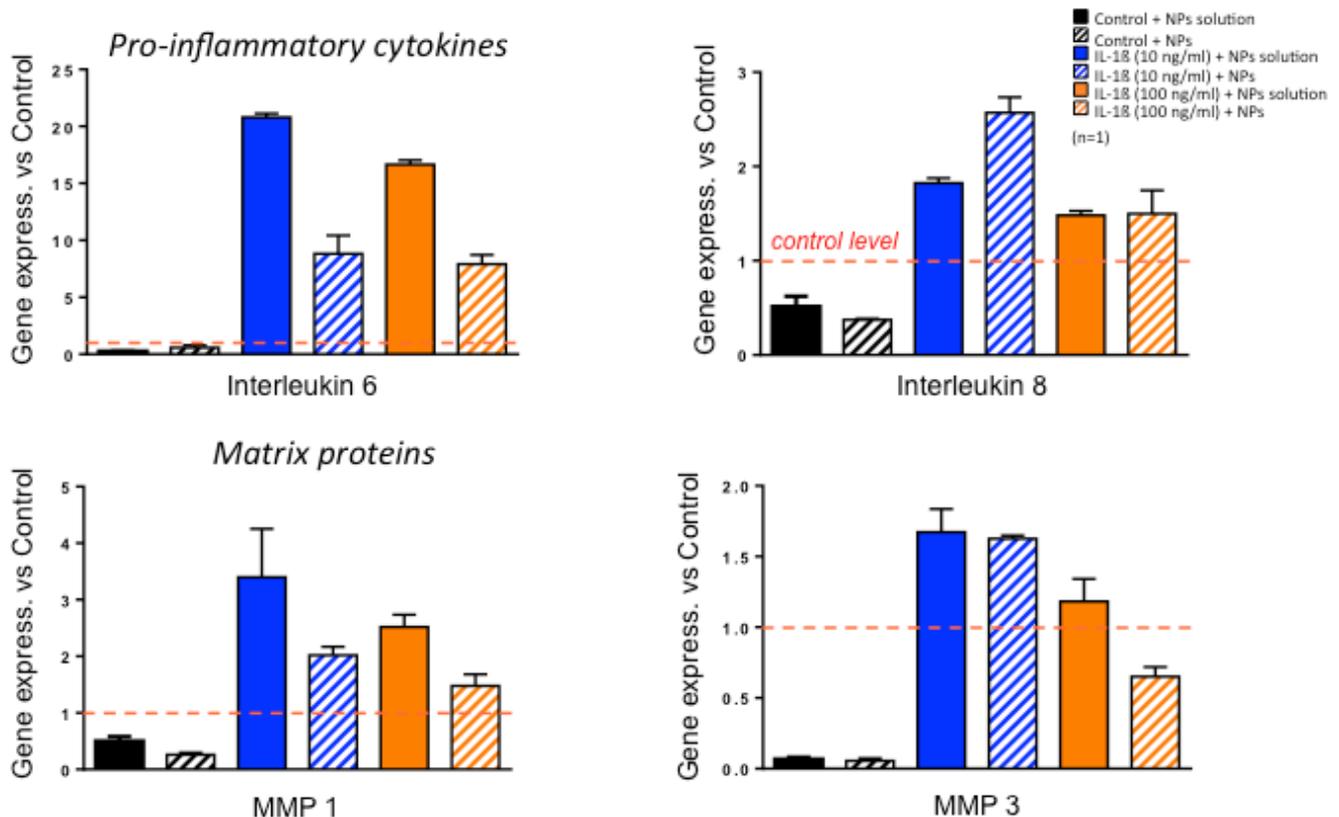


Abb. 10: Genexpression von Bandscheibenzellen unbehandelter Organkulturen (Control) ohne Zusatz von Interleukin (IL-1 β) oder nach Zusatz des inflammatorischen Stimulus (IL-1 β) und anti-inflammatorischer Behandlung mit Diclofenac-haltigen Nanopartikeln (NPs). Dargestellt sind Beispiele für Expressionsanalysen der pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin 6 und 8, sowie der Enzyme für Matrixabbau MMP1 und MMP3. Die Analysen erfolgten am Tag 8, 48h nach anti-inflammatorischer Behandlung. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt (n=2-4). (NPs = Nanopartikel, NPs solution = Pufferlösung für NPs)

Daraus kann geschlossen werden, dass durch Applikation Diclofenac-haltiger Nanopartikeln nicht nur die Entzündungsreaktion reduziert werden kann, sondern möglicherweise auch eine Verzögerung oder Reduktion des Matrixabbaus erzielt wird. Fortsetzende Studien müssen zeigen, ob dieses vielversprechende Ergebnis weiter untermauert werden kann.

3.4.2 Zelltherapeutischer Ansatz durch Injektion mesenchymaler Stammzellen (hMSC).

Durch Injektion mesenchymaler Stammzellen (MSCs) in die Bandscheiben-Organokulturen bzw. durch Zusatz der MSC-Zellen in einem Ko-Kulturansatz (C + MSC bzw. IL-1 β + MSC) konnte eine mögliche anti-inflammatorische Wirkung dieser Zelltherapie simuliert werden. Auswertungskriterien waren dabei die Genexpression sowie die PGE₂-Bestimmung in den Medienüberständen (Abb. 11).

Durch Zugabe mesenchymaler Stammzellen mittels Zellinjektion in einem Albugel-Trägermaterial oder durch externe Applikation der MSCs in einem Ko-Kulturansatz (MSC-Alb) wurden sehr unterschiedliche Effekte auf die PGE₂-Konzentration sowie auf die Genexpression verschiedener Zielgene für Matrixabbau und Entzündung beobachtet. Die Ergebnisse zeigen, dass MSCs verschiedener Spender sehr unterschiedlich auf das pro-inflammatorische Environment reagieren. Bezüglich der PGE₂-Konzentration wurde in manchen Spendern eine deutliche Erhöhung durch Zugabe von MSCs oder Injektion beobachtet. Die Zugabe von IL-1 β verstärkte diesen Effekt, was darauf hindeutet, dass MSCs bei Anwesenheit von IL-1 β die pro-inflammatorische Wirkung verstärken

Untersuchungen zu regenerativen und anti-inflammatorischen Therapiekonzepten der Bandscheibendegeneration im Organkulturmodell

können. Nur bei zwei Spendern konnte eine leichte Reduzierung der PGE_2 durch Zugabe von MSCs beobachtet werden. Es sind weiterführende Untersuchungen erforderlich, um diese Zusammenhänge und deren Korrelation mit den In-vitro-Eigenschaften der MSCs unterschiedlicher Spender aufzuklären.

Da die MSCs in eine Umgebung mit einer erhöhten Konzentration an $\text{IL-1}\beta$ eingebracht wurden ist denkbar, dass dieser Faktor auch die MSCs zur Produktion von Entzündungsfaktoren stimuliert. Die Auswertung der Kontrollgruppe, die nur MSCs enthielt und mit $\text{IL-1}\beta$ behandelt wurde, bestätigte diese Hypothese. Eine signifikante anti-inflammatorische Wirkung der MSCs, wie sie in der Literatur beschrieben wird konnte durch unsere eigenen Ergebnisse nicht bestätigt werden. Möglicherweise wäre ein späterer Zeitpunkt der Zelltherapie nach Abklingung der inflammatorischen Reaktion der Zellen sinnvoller und würde anderer Ergebnisse zeigen.

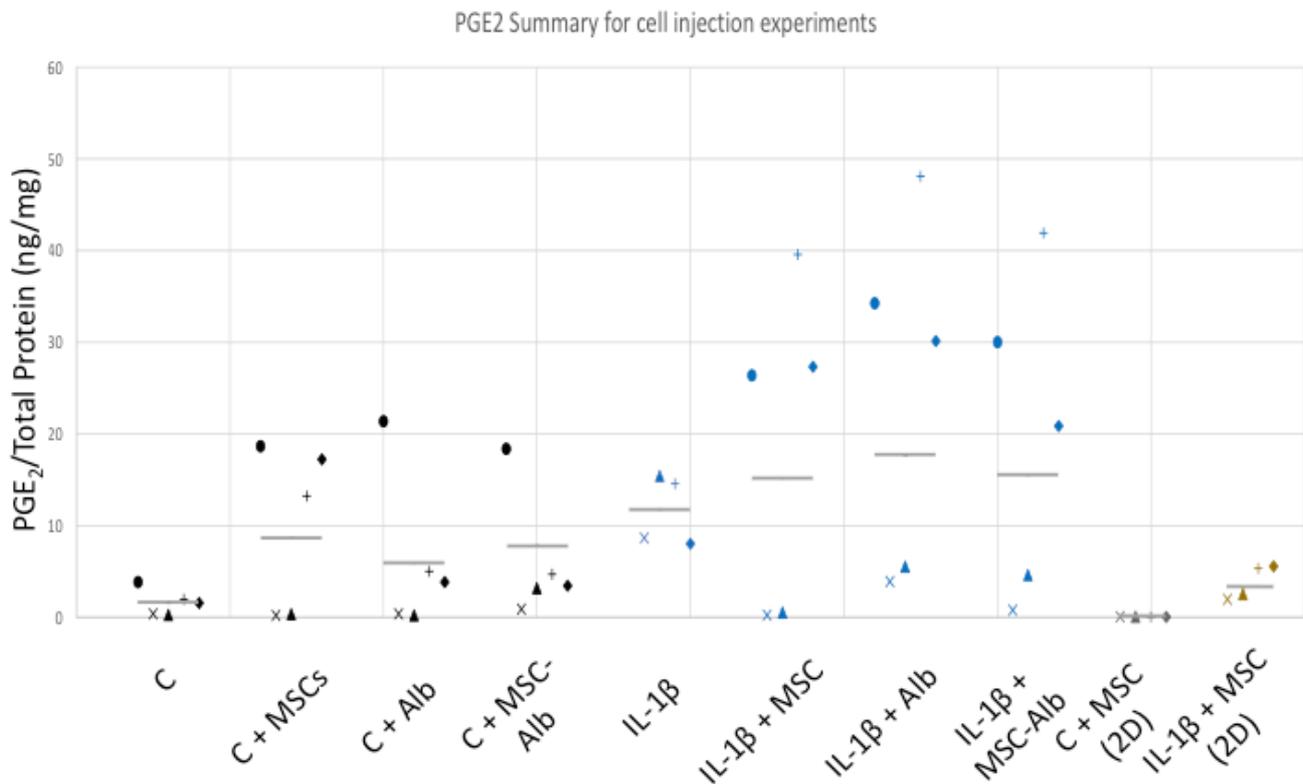


Abb. 11: Darstellung der PGE_2 -Ergebnisse in Kontrollen ohne $\text{IL-1}\beta$ -Stimulation (schwarz), nach Simulation inflammatorischer Bedingungen durch Zugabe von $\text{IL-1}\beta$ (blau) und - als Vergleichsgruppe - in Überständen von MSCs in 2D-Kultur mit bzw. ohne $\text{IL-1}\beta$ -Behandlung ($n=4$). Die unterschiedlichen Symbole repräsentieren vier unabhängige Versuchsreihen, bei denen die MSCs von vier verschiedenen Spendern für die Zelltherapie verwendet wurden. (C = Kontrollen, MSCs = mesenchymale Stammzellen, Alb = Serumalbumin-Hydrogel, 2D = Monolayerkultur).

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen bestätigen die Befunde der PGE_2 -Analysen und erlauben eine Unterscheidung zwischen den Effekten in der Bandscheibenumgebung (Verwendung von Primern für bovine Zielgene) und dem Beitrag der humanen MSCs (Verwendung humaner Primer) zu den beobachteten Effekten. Es zeigt sich, dass die Spendervariabilität besonders auf die humanen MSCs zurückzuführen ist und dass diese - je nach Spendereigenschaften - die Inflammation leicht reduzieren oder aber auch verstärken können.

Untersuchungen zu regenerativen und anti-inflammatorischen Therapiekonzepten der Bandscheibendegeneration im Organkulturmodell

4. Diskussion

Das hier vorgestellte bovine Organkulturmodell eignet sich für die In-vitro-Testung biologischer Behandlungsstrategien der Bandscheibendegeneration. Es ermöglicht die Simulation inflammatorischer und degenerativer Bedingungen, die über Genexpressionsbestimmungen und Analysen des Nährmediums bezüglich von Parametern zu Entzündung (PGE₂), Glucoseverbrauch und Lactatbildung eine Aussage zum Zellstoffwechsel in den Organkulturen erlauben. Durch Injektion von Zellen oder die Applikation biomaterial-basierter Freisetzungssysteme können anti-inflammatorische Therapieansätze unter kontrollierten Bedingungen getestet werden. Das Modell trägt damit auch zur Reduktion von Tierversuchen bei. Es bietet neue Möglichkeiten zur Testung und Evaluation biologischer Behandlungsverfahren der Bandscheibendegeneration.

5. Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass sich mit Hilfe eines biomaterial-basierten Therapie-Ansatzes der Bandscheibendegeneration unter Verwendung von Diclofenac-Nanopartikeln entzündungsreduzierende Effekte in der Bandscheibe erzielen lassen, die möglicherweise auch für einen klinischen Einsatz vielversprechende Einsatzmöglichkeiten bieten könnten. Die ersten Ergebnisse des zelltherapeutischen Ansatzes zeigen jedoch, dass bei Applikation mesenchymaler Stammzellen in eine Umgebung mit erhöhter Konzentration an Entzündungsfaktoren (hier getestet für IL1 β) berücksichtigt werden muss, dass diese Zellen durch lokal vorhandene Entzündungsfaktoren selbst zur Produktion inflammatorischer Faktoren angeregt werden könnten und damit die Entzündungsantwort möglicherweise nicht gehemmt sondern sogar eher verstärkt wird. Unsere ersten Ergebnisse müssen noch durch weiterführende Studien bestätigt werden. Möglicherweise hätte eine spätere Applikation der MSCs zu einem Zeitpunkt mit bereits deutlich abgeklungener Entzündungsreaktion durchaus eine positive Wirkung. Es ist aber zu bedenken, dass sich MSCs unterschiedlicher Spender stark unterscheiden und dadurch eine grundsätzliche zelltherapeutische Verwendung von MSCs in einem inflammatorischen Bandscheibenenvironment kritisch bewertet werden muss.

Ulm, 17.04.2014

Ort, Datum



Dr. Cornelia Neidlinger-Wilke

Ersteller des Prüfberichts