

Deutsche Wirbelsäulenstiftung
Herr Prof. Dr. C. Carstens
Herr Prof. Dr. H.-J. Wilke
Helmholtzstraße 14

D – 89081 Ulm

Klinikdirektor CA Dr. med. A. Niedeggen
Telefon: +49 30 56 81-3401
Fax: +49 30 56 81-3403
E-Mail: Andreas.Niedeggen@ukb.de
Thomas.Liebscher@ukb.de
Datum: 25.06.2016

Abschlussbericht

„Diagnostik und Therapie molekularer und genetischer Veränderungen von bandscheibenbedingten Rückschmerzen“

Projektleitung: Dr. med. Thomas Liebscher

Gefördert von der Deutschen Wirbelsäulenstiftung
Datum Zuwendungsbescheid: 11.12.2013

Hauptantragsteller: **Dr. med. Thomas Liebscher**
stellv. Chefarzt
Behandlungszentrum für Rückenmarkverletzte
Unfallkrankenhaus Berlin
Warener Str. 7
12683 Berlin
Tel. 030/5681-0
E-Mail: thomas.liebscher@ukb.de

Nebenantragsteller: **Dr. Karin Wuertz**
Institut für Biomechanik
ETH Zürich, HPP O12
Schafmattstrasse 30
8093 Zürich, Schweiz
Tel: +41 44 63 38126
Email: kwuertz@ethz.ch

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	3
2 Zielsetzungen	4
<u>2.1 Welcher Nutzen hat das Projekt für Patienten?</u>	4
<u>2.2 Welchen Nutzen hat das Projekt für das Verständnis von Wirbelsäulenerkrankungen?</u>	4
3 Methodik	5
<u>3.1 Arbeitsblock 1</u>	5
<u>3.2 Arbeitsblock 2</u>	6
3.2.1 Genexpressionsanalyse des Bandscheibengewebes mittel qPCR.....	6
3.2.2 Immunoblotting des Bandscheibengewebes.....	6
<u>3.3 Statistische Auswertung</u>	7
4 Ergebnisse	7
<u>4.1 Hyaluronidase (HYAL) Projekt</u>	9
<u>4.2 TRP Projekt</u>	11
5 Diskussion	12
6 Publikationen und Präsentationen 2013 - 2015	12
7 Verantwortliche Institution für die Verwaltung der Fördergelder	13
8 Anhang	13
<u>8.1 Nachweis Mittelverwendung</u>	13

1 Einleitung

Rückenschmerzen sind eine der am weitesten verbreiteten Krankheiten der westlichen Länder, die für die Patienten mit einem hohen Leidensdruck und für das Gesundheitssystem und die Wirtschaft mit sehr hohen direkten und indirekten Kosten verbunden sind. „Unspezifische“ Rückenschmerzen treten bei einer Vielzahl von Patienten auf, bei denen abgesehen von einer Bandscheibendegeneration keine eindeutigen bildmorphologischen Auffälligkeiten bestehen. Als Ursache kommen bestimmte molekulare und genetisch bedingte Veränderungen während der Bandscheibendegeneration in Frage. Zu diesen Veränderungen zählen zum Beispiel die Bildung von matrixabbauenden Enzymen bzw. die daraus resultierende Anhäufung spezifischer Matrix-Abbauprodukte, die Expression von Entzündungsrezeptoren und die vermehrte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen. Ziel der Studie ist es, die Entstehung von bandscheibenbedingten Rückenschmerzen in Zukunft besser erklären zu können und neue Behandlungsmaßnahmen zu entwickeln.

Die Studie schließt Patienten beide Geschlechter von 18 bis 85 Jahren ein:

1. Patienten mit Rückenschmerzen, deren Diagnose eine Wirbelsäulenoperation mit Entfernung der Bandscheibe zur Folge hat (= symptomatisch, n=500).
2. Patienten mit Wirbelsäulentrauma, deren Verletzung eine Operation mit Entfernung der Bandscheibe zur Folge hat (= asymptomatisch, n=200).

Kriterien sind der Pfirrmann Score anhand einer präoperativen MRT-Untersuchung, der Oswestry disability index und eine laborchemische Untersuchung. Das Bandscheibengewebe wird nach einem definierten Protokoll gewonnen und in der ETH Zürich aufgearbeitet. Im Labor werden die molekularen und genetisch bedingten Veränderungen auf Gen- und Proteinexpressionsebene ermittelt und mit dem Degenerationsgrad sowie der Diagnose korreliert.

Bisher konnte die Bedeutung von "human high temperature requirement serine protease A1" (HTRA1) in der Pathogenese der Bandscheibendegeneration nachgewiesen werden. In einer anderen Arbeit zeigte sich, dass die in der chinesischen Medizin bekannte „Wilfords Dreiflügelfrucht“ einen anti-inflammatorischen Effekt durch Senkung der Genexpression von proinflammatorischen Zytokinen hat. In vor kurzem publizierten Studien konnte des Weiteren gezeigt werden, dass das Polyphenol EGCG nicht nur anti-inflammatorische und anti-katabole Wirkung on Bandscheibenzellen hat, sondern diese auch vor den negativen Auswirkungen von oxidativem Stress schützen.

Rückenschmerzen, die auch ohne wesentliche degenerative Veränderungen eines Bewegungssegmentes auftreten, können auf molekulare Veränderungen der Bandscheibe zurückgeführt werden. Unsere Hypothese der Aktivierung von Schmerzrezeptoren durch die Akkumulation spezifischer Abbauprodukte oder die Produktion erhöhter Level an proinflammatorischen Zytokinen soll durch Fokussierung auf einige mögliche potente Moleküle bestätigt werden, um in Zukunft neue Medikamente entwickeln zu können.

2 Zielsetzungen

2.1 Welcher Nutzen hat das Projekt für Patienten?

Rückenschmerzen und insbesondere bandscheibenassoziierte Beschwerden sind eine der am weitesten verbreiteten Krankheiten in Deutschland, die für die Patienten mit einem hohen Leidensdruck verbunden sind. Der akute Rückenschmerz ist über einen Zeitraum von sechs Wochen definiert und geht in den subakuten Rückenschmerz bis zur 12. Woche über. Etwa 10% aller Fälle entwickeln einen chronischen Verlauf. Bis Heute gibt es für bandscheibenassoziierte Beschwerden sowohl in der (sub)akuten als auch chronischen Phase keine spezifische medikamentöse Therapie. Die aktuelle medikamentöse Therapie ist in der Nationalen Versorgungsleitlinie Kreuzschmerz beschrieben.

Anhand der Resultate dieser Studien sollen in die Praxis umsetzbare therapeutische Maßnahmen zur Schmerzbehandlung entwickelt werden. Als vielversprechend gelten aktuell Antagonisten proinflammatorischer Zytokine und/oder Proteaseinhibitoren. Ausserdem könnte eine Regulierung der Expression oder Aktivität von Mechanosensoren ein Fortschreiten der Degeneration entgegenwirken.

2.2 Welchen Nutzen hat das Projekt für das Verständnis von Wirbelsäulenerkrankungen?

Das Bandscheibengewebe zeigt schon Anfang der 2. Lebensdekade degenerative Veränderungen auf molekularer, mikroskopischer und später auch makroskopischer Ebene. Diese können zu bandscheibenassoziierten Beschwerden führen. Dennoch gibt es zwischen der symptomatischen und asymptomatischen Population keinen wesentlichen Unterschied auf makroskopischer und mikroskopischer Ebene. Über molekulare Veränderungen ist bis Heute wenig bekannt. In symptomatisch degenerativ veränderten Bandscheiben treten erhöhte Level von proinflammatorischen Zytokinen und katabolen Faktoren auf. Mögliche Kaskaden über proteinspaltende Enzyme, Akkumulation spezifischer Abbauprodukte und die Expression von Entzündungsrezeptoren sind bis Heute unklar.

Durch die Ergebnisse dieser Studie soll die Pathogenese von bandscheibenbedingten Rückenschmerzen auch ohne bildmorphologisches Korrelat in Zukunft besser erklärt werden können. Im Fokus steht dabei, den bisher wenig bekannten Mechanismus der Schmerzentstehung während des Prozesses der Bandscheibendegeneration zu erkennen. Durch die Identifikation spezifischer molekularer Veränderungen in einer sich degenerierenden Bandscheibe könnte der fehlende Zusammenhang zwischen Degeneration, Inflammation und Rückenschmerz hergestellt werden.

3 Methodik

3.1 Arbeitsblock 1

Es werden Patienten mit einem Alter von 18 – 85 Jahren in die Studie eingeschlossen, welche aufgrund von Rückenschmerzen bei degenerativen Veränderungen der Wirbelsäule oder aufgrund eines Wirbelsäulentraumas eine Wirbelsäulenoperation erhalten. Die Studienaufklärung erfolgt in ausreichendem Abstand zur Operation vor dem Eingriff. Bei einem Wirbelsäulentrauma kann der Fall eintreten, dass der Patient initial nicht aufklärungs- und somit nicht einwilligungsfähig ist. In diesen Fällen werden das Gewebe und die Proben entnommen und solange gelagert, bis eine Studienaufklärung möglich ist. Ist der Patient mit der Studienteilnahme einverstanden, werden die Daten in der Datenbank eingegeben und das Gewebe an die ETH Zürich geschickt. Bei einer Studienablehnung werden alle Materialien und Daten vernichtet (siehe Abb. 1).

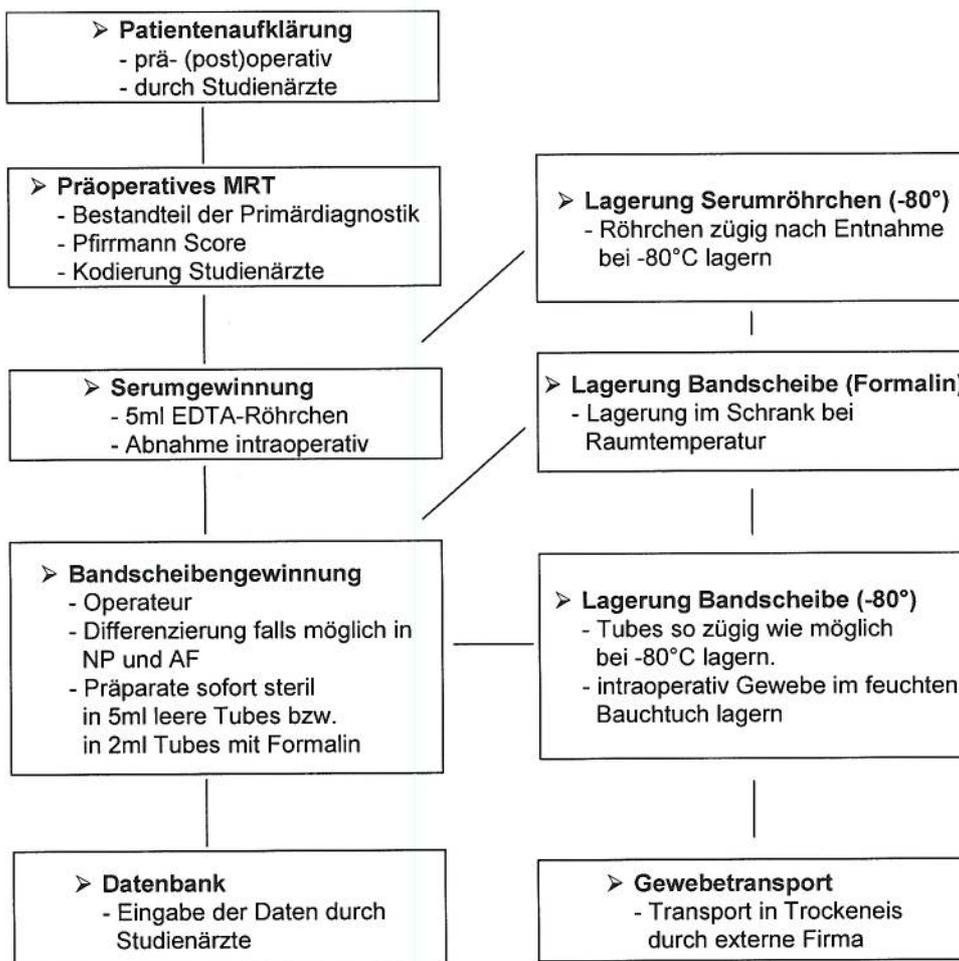


Abb. 1: Studienablauf in der Klinik

3.2 Arbeitsblock 2

In diesem Arbeitsblock wird das Bandscheibengewebe der „asymptomatischen“ und der „symptomatischen“ Gruppe verglichen, wobei die Korrelation zwischen dem Auftreten bestimmter Marker, die pathologisch oder therapeutisch von Interesse sind, und dem Degenerationsgrad nachgewiesen werden soll. Aktuell werden folgende Marker untersucht:

- Hyaluronidase Typ 1, Hyaluronidase Typ 2 und Hyaluronidase Typ 3, die spezifisch Hyaluronan (HA) spalten und somit zur Bildung von HA Fragmenten beitragen können. In einer bereits publizierten Arbeit⁽¹⁾ konnten wir zeigen, dass diese Fragmente eine vermehrte Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen anregen
- TRPC1, TRPC6, TRPV2, TRPV4 und TRPV6. Bei diesen Transient Receptor Potential Channels handelt es sich um Calcium-Kanäle, die wir vor kurzem in der Bandscheibe nachweisen konnten. Sie sind in anderen Gewebearten wichtige Mechanosensoren, deren Expression und Aktivität möglicherweise Degenerations- und Pathologie-abhängig ist. Eine Korrelation der Expression dieser Kanäle mit dem Degenerationsgrad in der Bandscheibe könnte erklären, warum Zellen erkrankter Bandscheiben anders auf mechanische Belastung reagieren als Zellen aus gesundem Gewebe.

3.2.1 Genexpressionsanalyse des Bandscheibengewebes mittel qPCR

Zur Untersuchung der Biopsien auf Genexpressionsebene wird zunächst aus den Proben RNA mittels einer Trizol-Spin Methode isoliert. Hierzu werden Teile des Gewebes mit flüssigem Stickstoff in einer selbst hergestellten Apparatur pulverisiert, und die RNA mittels Trizol Phasenseparation isoliert. In einem zweiten Schritt erfolgt eine weitere Aufreinigung der RNA über Affinity-based Spin Columns. Die Qualität und Quantität der isolierten RNA wird mittels Nanodrop bestimmt und in cDNA umgeschrieben. Die Genexpression der ausgewählten Zielgene wird schliesslich mittels qPCR unter Verwendung genspezifischer Taqman Primer bestimmt, auf die Expression eines Housekeeping Genes normalisiert und mittels $2^{-\text{dct}}$ Methode quantifiziert.

3.2.2 Immunoblotting des Bandscheibengewebes

Für das Immunoblotting werden Proteinextrakte vom Bandscheibengewebe gewonnen. Wie durch Tieden et al. beschrieben werden Teile des Gewebes mit flüssigen Stickstoff in einem selbst hergestellten Apparatur pulverisiert und die Proteine mit einer CellLytic M und proteaseinhibitorischen Mischung (beides Sigma Aldrich) extrahiert. Die Proteinmenge wird initial bestimmt durch ein Bio-Rad Protein-Assay. Die Proben werden in Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 6-8, 2% SDS, 10% Glycerol, 100 mM DTT, 0.002% Bromphenolblau) für 5 min erhitzt. Gleiche Proteinmengen werden auf SDS-Polyacrylamid Gel aufgebracht. Eine Korrektur der aufgetragenen Proteinvolumina erfolgt über eine densitometrische Analyse

mit Coomassie Blau gefärbten Gelen. Dies erlaubt den korrekten Vergleich zwischen den Bandscheibenproben der jeweiligen Patienten. Das Protein wird auf eine PVDF Membran geblottet und in 5% Milchpulver, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20 (TBST) inkubiert. Der Protein-Nachweis erfolgt über spezifische Antikörper). Nach dem dreimaligen Waschen mit TBST wird die Membran mit einem zweiten HRP-markierenden Antikörper inkubiert (1 Stunde bei RT). Danach erfolgt die Chemilumineszenz-Analyse (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific).

Alternativ zur Analyse mittels Immunoblotting können die Proteinextrakte mittels ELISA (falls kommerziell erhältlich) analysiert werden. Dadurch ist über den Vergleich mit einer Standardkurve eine Quantifizierung des Proteingehalts möglich.

3.3 Statistische Auswertung

Für alle quantitativ messbaren Werte (u. a. klinische Daten, Scores, Zellzahlen, Genexpression) wird ein direkter statistischer Vergleich zwischen der symptomatischen und asymptomatischen Gruppe, der in vitro behandelten und unbehandelten Gruppe, der in vitro unterschiedlich behandelten Gruppe oder dem entsprechenden Experimentdesign zugrundeliegenden Fragestellung durchgeführt. Der statistische Vergleich erfolgt mittels ANOVA, mit (je nach Versuchsdesign) geeignetem Post-hoc Testing. Zur Auswertung wird mittels des SPSS-Statistik Programms das Signifikanzlevel berechnet, wobei $p < 0.05$ als signifikant angesehen wird. Für jedes Experiment wird die Anzahl an Versuchen so gewählt, dass eine ausreichende statistische Power vorhanden ist.

4 Ergebnisse

Die Studie hat Patienten mit einem Alter von 18 bis 85 Jahren eingeschlossen.

Für die Auswertungen wurde in der Gruppe von Patienten mit Rückenschmerzen, deren Diagnose eine Wirbelsäulenoperation mit Entfernung der Bandscheibe zur Folge hat (= symptomatisch) insgesamt 223 Patienten eingeschlossen. Die Geschlechterverteilung war in dieser Gruppe ähnlich (w : m = 105x : 118x), bei einem mittleren Alter von $54,8 \pm 14,9$ Jahren. Es wurden 277 Proben gewonnen. Die Verteilung der Entnahmestelle ist in Abbildung 2 dargestellt.

Für die Auswertungen wurden in der Gruppe von Patienten mit einer Verletzung, die eine Operation mit Entfernung der Bandscheibe zur Folge hat (= asymptomatisch) 106 Patienten eingeschlossen. Die Geschlechterverteilung war überwiegend männlich (w : m = 25x : 81x), bei einem mittleren Alter von $50,7 \pm 16,8$ Jahren. Es wurden 180 Proben gewonnen. Die Verteilung der Entnahmestelle ist in Abbildung 2 dargestellt.

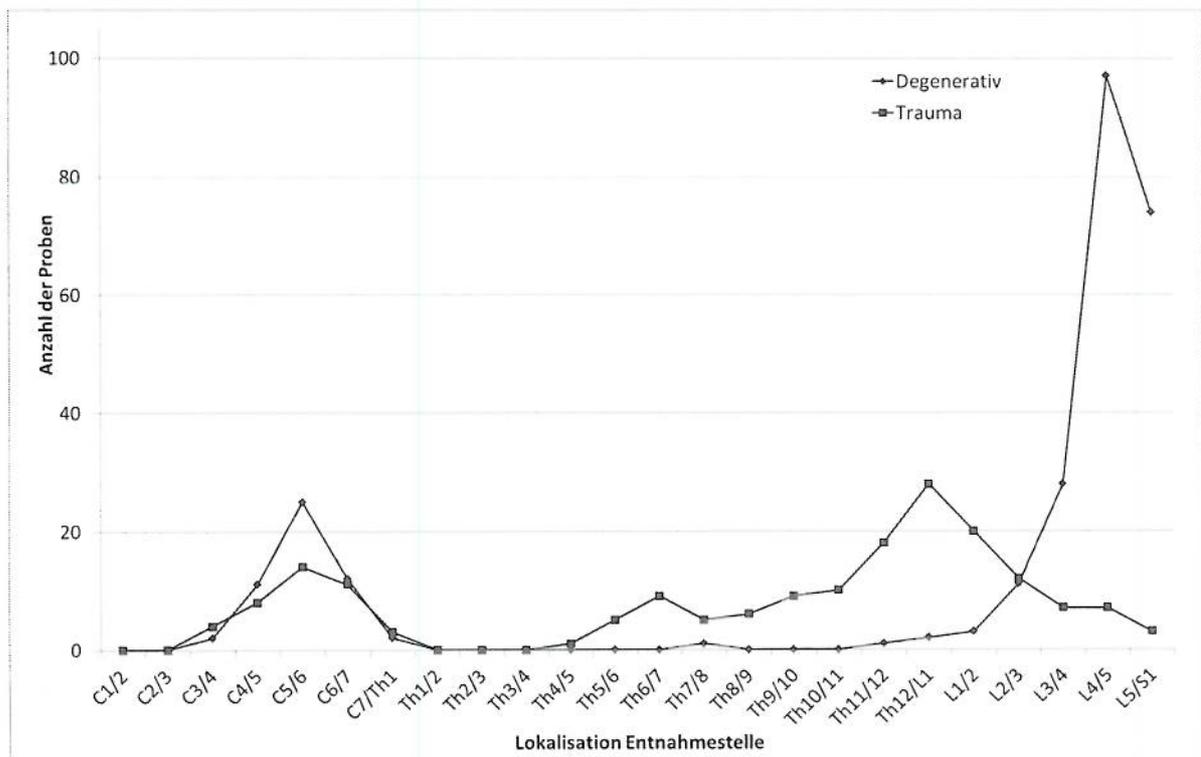


Abbildung 2: Verteilung und Lokalisation der Probenentnahmen der jeweiligen Gruppen.

Die Bandscheibengewebe wurden nach einem definierten Protokoll gewonnen, im ukb bei -80° Zwischengelagert, an die ETH Zürich geschickt und dort aufgearbeitet.

Bei allen Patienten wurde der Oswestry disability index erhoben und eine laborchemische Untersuchung durchgeführt.

In 90% der Fälle wurde eine MRT-Untersuchung durchgeführt und anschließend im iSite Enterprise Philips Electronics N.V. – System anonymisiert und lokal gespeichert. Die für die Auswertung nötigen sagittalen T2-gewichteten MRT-Aufnahmen wurden entsprechend markiert. Ebenso wurden alle Daten pseudo-anonymisiert auf CRF-Bögen dokumentiert und in einer Excel-Datei gespeichert. Die Daten werden in der noch zu erstellenden multizentrisch zu nutzenden Datenbank eingepflegt. Die unter MS Access geplante Datenbank ist in ein Frontend, welches die Dateneingabemasken mit Plausibilitätsprüfung und Berichtformulare besteht, und zwei Backends aufgeteilt. Das erste Backend enthält die persönlichen Patientendaten, während sich im zweiten Backend die anonymisierten Daten inklusive der Bilddateien im originalen DICOM-Format befinden. Hierdurch wird zum einen eine maximale Datensicherheit erreicht. Die zentrale Datenbank wird sich im Behandlungszentrum für Rückenmarkverletzte, Unfallkrankenhaus Berlin, Warener Str. 7, 12683 Berlin befinden.

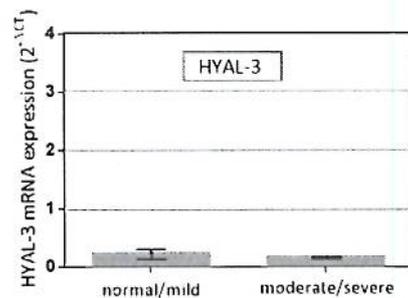
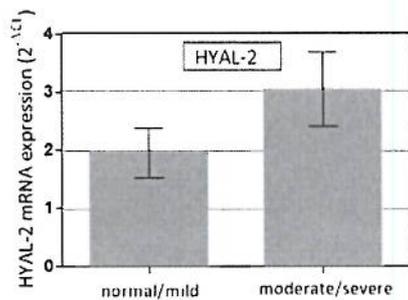
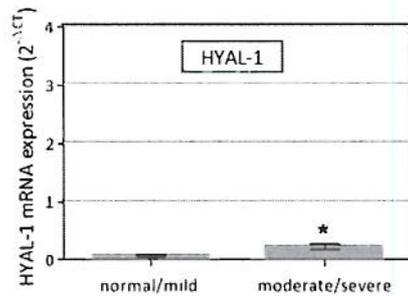
Im Folgenden werden die Ergebnisse der zwei aktuellsten Studien vorgestellt:

4.1 Hyaluronidase (HYAL) Projekt

HYAL-1, HYAL-2 und HYAL-3 konnten in Bandscheibenproben auf mRNA Ebene nachgewiesen werden, wobei die Expression von HYAL-1 und HYAL-2 im Vergleich zu HYAL-3 relativ niedrig war. Bandscheiben mit ausgeprägter Degeneration hatten eine statistisch erhöhte HYAL-1 Expression (Average $2^{-\Delta Ct} = 0.23$) im Vergleich zu Bandscheiben mit geringer Degeneration (Average $2^{-\Delta Ct} = 0.08$). Für HYAL-2 konnte nur ein Trend zu einer erhöhten Expression festgestellt werden, während es für HYAL-3 keine Unterschiede in der Expression in den verschiedenen Degenerationsgruppen gab. Auf Proteinebene konnten wir nur für HYAL-2 eine statistisch signifikante Erhöhung nachweisen (Abbildung 2). In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass HYALs vor allem mittels Aktivitätsänderung und weniger durch Expressionsänderung reguliert werden. Deswegen wird aktuell die Aktivität von HYALs mittels eines spezifischen Activity Assays an Bandscheibenproben mit unterschiedlichem Degenerationsgrad untersucht.

Zusätzlich wurde in dieser Studie untersucht, ob ein vermehrtes Auftreten von Zytokinen die Expression oder die Aktivität von HYALs verändert. Hierzu wurden Zellkulturversuche durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass es insgesamt zu nur sehr geringen Veränderungen in der Expression und auch der Aktivität der HYALs unter entzündlichen Bedingungen kam.. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress alleine ebenfalls kaum eine Auswirkung auf die HYAL Expression und Aktivität hat. In einem abschließenden Versuch wird aktuell untersucht, ob – ähnlich in wie Knorpelzellen beschrieben – das gemeinsame Auftreten von Entzündung und oxidativem Stress eine veränderte Zellantwort hervorruft.

HYAL mRNA expression in Tissue



HYAL protein expression in Tissue

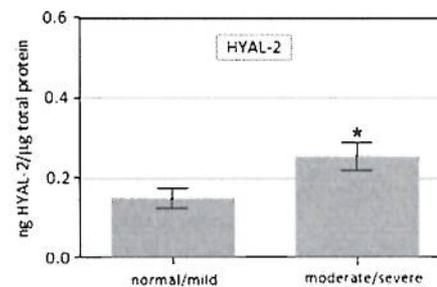
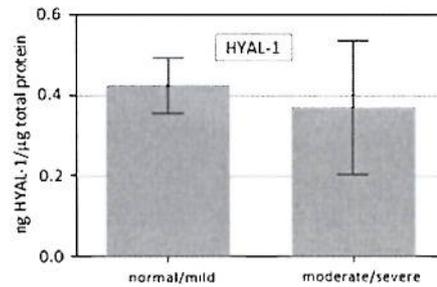


Abbildung 3: Expression von HYAL-1, HYAL-2 und HYAL-3 in humanen Bandscheiben mit geringer oder ausgeprägter Degeneration. Links: Genexpression (n=8 für keine/geringe Degeneration; n=16 für moderate/starke Degeneration). Rechts: Proteinexpression (n=5). Mittelwert ± SEM.

4.2 TRP Projekt

In humanen Bandscheiben konnten wir die Expression von TRPC1, TRPC6, TRPV2, TRPV4 und TRPV6 nachweisen. Interessanterweise sind in bovinen Bandscheiben lediglich TRPC1 und TRPV4 exprimiert. Ob es sich dabei um Speziesunterschiede handelt oder ob das unterschiedliche Expressionsprofil mit dem Alter der Spender und dem Degenerationsgrad zu tun hat ist bisher noch nicht geklärt.

Die Expression von TRPC6, TRPV2 und TRPV6 zeigte sehr grosse Schwankungen zwischen den Spendern, so dass bisher keine klare Aussage getroffen werden kann. In dem bisher relativ kleinen Set von Proben (n =6 für keine/geringe Degeneration; n=6 für moderate/starke Degeneration) zeigten sich jedoch Trends für eine degenerationsabhängige Genexpression, wobei sowohl die Expression von TRPC1 als auch von TRPV4 tendentiell erhöht war (Abbildung 3).

Nach erfolgreicher Beantragung von Forschungsgeldern durch den Schweizer Nationalfond werden aktuell erste Genarrays durchgeführt, um die Expression der gesamten TRP Familie in Bandscheiben (in Abhängigkeit vom Degenerationsgrad) im Detail zu untersuchen. Des Weiteren konnte mittels Zellkulturversuchen bereits gezeigt werden, dass TRPC6 eine wichtige Rolle im Mechanosensing von Bandscheibenzellen zu spielen scheint und dass sich die Expression dieses Ionenkanals signifikant mit der Zellalterung ändert.

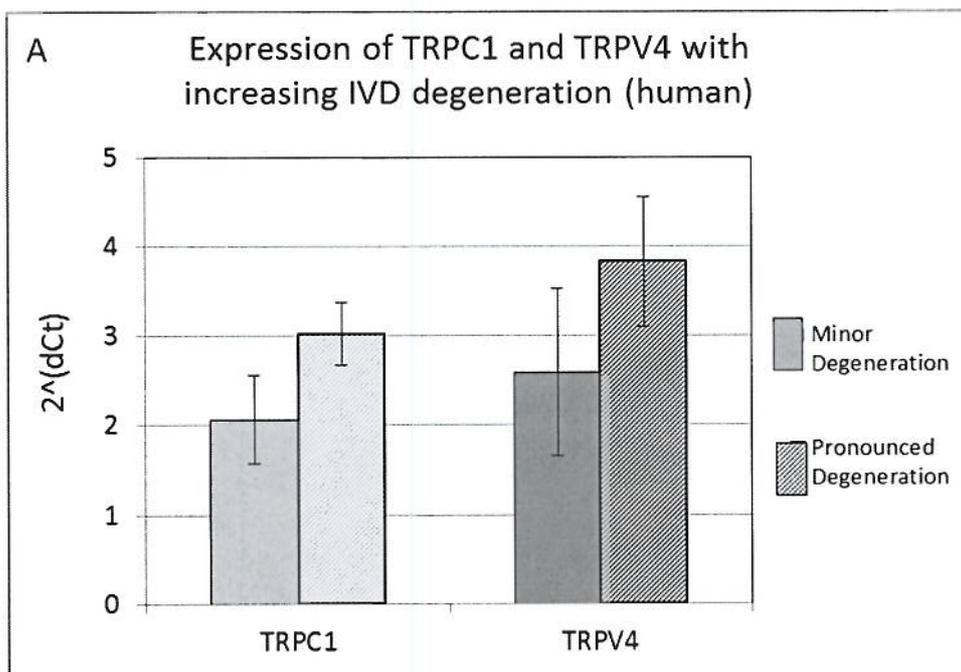


Abbildung 4: Expression von TRPC1 und TRPV4 in humanen Bandscheiben mit geringer oder ausgeprägter Degeneration (n=6 für keine/geringe Degeneration; n=6 für moderate/starke Degeneration. Mittelwert \pm SEM.

5 Diskussion

Unsere aktuellen Untersuchungen zeigen, dass die Expression mancher der ausgewählten Kandidaten abhängig vom Degenerationsgrad und der Symptomatik ist. Auf Grund der Schwankungen zwischen den Spendern wird eine relativ hohe Zahl an Proben in der Gruppe benötigt um statistische Signifikanzen zu erreichen. Durch neue angeworbene Drittmittel können diese kostenintensiven Versuche nun an den bereits gesammelten Proben durchgeführt. Diese Versuche werden es hoffentlich erlauben, neue therapeutische Targets zu identifizieren und basierend darauf neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln und experimentell untersuchen.

6 Publikationen und Präsentationen 2013 - 2015

- (1) Hyaluronic acid fragments enhance the inflammatory and catabolic response in human intervertebral disc cells through modulation of toll-like receptor 2 signaling pathways.
Quero L, Klawitter M, Schmaus A, Rothley M, Sleeman J, Tiaden NA, Klasen J, Boos N, Hottiger MO, Wuertz K*, Richards JP*
Arthritis Research and Therapy, 2013 Aug 22;15(4):R94
- (2) Expression and regulation of Toll-like receptors (TLRs) in human intervertebral disc cells.
Klawitter M, Hakozaki M, Kobayashi H, Quero L, Krupkova O, Ospelt C, Gay S, Hausmann O, Liebscher T, Meier U, Sekiguchi M, Konno S, Boos N, Ferguson SJ, Wuertz K
Eur Spine Journal, 2014 Sep;23(9):1878-91
- (3) Expression and Activity of Hyaluronidases in the Intervertebral Disc
Greutert H, Krupkova O, Hausmann O, Liebscher T, Meier U, Ferguson SJ, Wuertz-Kozak K
In Submission
- (4) Präsentation DWG Tagung 2015:
Expression and Activity of Hyaluronidases in the Intervertebral Disc
Greutert H, Krupkova O, Hausmann O, Liebscher T, Meier U, Ferguson SJ, Wuertz-Kozak K
- (5) The relevance of TRPC1 and TRPC6 in intervertebral disc mechanotransduction.
Franco-Obregon A, Greutert H, Liebscher T, Klasen J, Ferguson SJ, Wuertz-Kozak K
In Submission

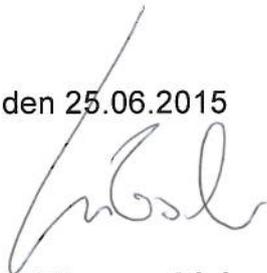
- 6) Präsentation Spineweek 2016:
Expression, regulation and relevance of hyaluronidases in the intervertebral disc
Wuertz-Kozak K, Greutert H, Krupkova O, Gantenbein B, Boos N, Ferguson SJ

7 Verantwortliche Institution für die Verwaltung der Fördergelder

Kassenberechtigte Stelle:
PD Dr. med. Dirk Stengel
Leiter Institut für Klinische Forschung
Unfallkrankenhaus Berlin
Verein für Berufsgenossenschaftliche Heilbehandlung Berlin e.V.
Warener Strasse 7
12683 Berlin
Deutschland
Tel. 030 5681 3030

Bankverbindung
Commerzbank AG
Konto-Nr.: 0613000/02
BLZ: 120 400 00

Berlin, den 25.06.2015



Dr. med. Thomas Liebscher
stellv. Chefarzt
Facharzt für Orthopädie und Unfallchirurgie
Behandlungszentrum für Rückenmarkverletzte
Unfallkrankenhaus Berlin

8 Anhang

8.1 Nachweis der Mittelverwendung